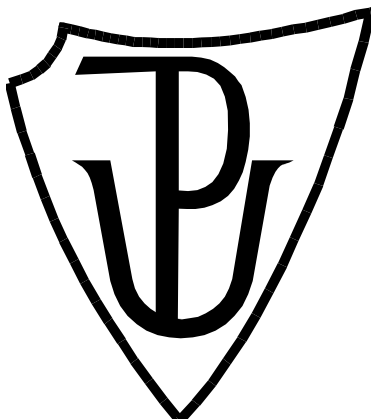


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie



**PRŮKAZ A STANOVENÍ VYBRANÝCH
AMATOXINŮ VE VZORCÍCH S BIOLOGICKOU
MATRICÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Veronika Saporová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

OLOMOUC 2015

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně
za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

.....

/vlastnoruční podpis/

Poděkování

Mé poděkování patří vedoucímu této diplomové práce doc. RNDr. Petru Fryčákovi, Ph.D., za odborné vedení této práce, za rady, které mi byly poskytnuty během vypracovávání této práce a také za čas věnovaný práci v laboratoři. Také děkuji RNDr. Barboře Papouškové, Ph.D., za výpomoc při řešení problémů s přístroji v laboratoři.

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá problematikou houbových otrav především faloidního typu, které jsou způsobeny požitím muchomůrky zelené. Teoretická část diplomové práce popisuje různé druhy otrav, toxiny způsobující otravu organismu a také množství metod, které již byly vyvinuty za účelem rychlého a spolehlivého stanovení houbových toxinů. Praktická část diplomové práce se zaměřuje na vyvinutí rychlé a jednoduché LC-MS metody pro stanovení amatoxinů muchomůrky zelené a to konkrétně alfa-amanitinu a beta-amanitinu. K tomuto účelu bylo použito spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotností detekcí využívající trojitý kvadrupól. V praktické části je zahrnuta také extrakce a stanovení těchto toxinů v muchomůrce zelené, v houbové polévce a v moči. Vzorky moče byly spikovány alfa-amanitinem na koncentraci 5 ng/ml. Kvantifikace amatoxinů probíhala metodou kalibrační křivky sestavené za použití kyseliny dinitrobenzoové jako interního standardu. Extrakce analytů byla provedena na SPE kolonkách. Použitím dipeptidu při SPE se zvýšila návratnost amatoxinů na 94 %. Metoda je dostatečně citlivá jak pro stanovení amatoxinů například ve zbytcích potravy, tak v moči, kde je obsah amatoxinů nižší. Alfa-amanitin byl derivatizován dansyl-chloridem za účelem zvýšení odezvy. Bylo zjištěno, že derivatizace nemá významný vliv na odezvu alfa-amanitinu. Metodou bylo dosaženo meze detekce 5 ng/ml pro alfa-amanitin a 10 ng/ml pro beta-amanitin. Mez kvantifikace byla stanovena na 30 ng/ml pro alfa-amanitin a 100 ng/ml pro beta-amanitin.

Summary

This diploma thesis deals with mushroom poisoning especially of fatal type which is caused by ingestion of *Amanita phalloides*. The theoretical part of the thesis describes various types of poisoning, toxins which cause poisoning of an organism and also a lot of methods that have been developed for rapid and reliable determination of fungal toxins. Experimental part of the thesis aims to develop rapid and simple LC-MS method for the determination of amatoxins of *Amanita phalloides* – namely alpha-amanitin and beta-amanitin. This was achieved by employing high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection using a triple quadrupole analyser. The experimental part also includes the extraction, determination and quantification of these amatoxins in *Amanita phalloides*, mushroom soup and urine. The urine samples were spiked with alpha-amanitin at a concentration of 5 ng/ml. The quantification of the amatoxins was based on a calibration curve that had been created using dinitrobenzoic acid as an internal standard. The extraction of the analytes was performed using SPE columns. Recovery of the amatoxins have increased to 94 % using a dipeptide during the SPE. The method is sufficiently sensitive to determine the amatoxins both in e.g. residues of food and in the urine samples, where the content of the amatoxins is lower. Alpha-amanitin was derivatized with dansyl-chloride in order to increase its response. It was found, however that the derivatization had no significant effect on increasing its response. The method has reached a detection limit of 5 ng/ml for the alpha-amanitin and 10 ng/ml for the beta-amanitin. The limit of quantification was set at 30 ng/ml for the alpha-amanitin and 100 ng/ml for the beta-amanitin.

OBSAH

1. ÚVOD.....	- 7 -
2. TEORETICKÁ ČÁST	- 8 -
2.1 Jedovaté houby	- 8 -
2.1.1 Muchomůrka červená	- 9 -
2.1.2 Muchomůrka zelená.....	- 10 -
2.2 Houbové otravy	- 11 -
2.2.1 Gastrointestinální syndrom	- 12 -
2.2.2 Muskarinový syndrom	- 12 -
2.2.3 Psilocybinový syndrom (psychotropní).....	- 13 -
2.2.4 Mykoatropinový syndrom	- 13 -
2.2.5 Faloidní syndrom	- 13 -
2.2.6 Orellaninový syndrom	- 14 -
2.2.7 Gyromitrinový syndrom	- 14 -
2.3 Houbové toxiny.....	- 14 -
2.3.1 Alfa-amanitin a beta-amanitin	- 17 -
2.3.2 Kyselina ibotenová.....	- 21 -
2.3.3 Muscimol.....	- 23 -
2.3.4 Muskarin	- 24 -
2.4 Identifikace a stanovení houbových toxinů	- 25 -
2.4.1 Identifikace a stanovení alfa a beta-amanitinu	- 25 -
2.4.2 Identifikace a stanovení muscimolu a kyseliny ibotenové	- 30 -
2.4.3 Identifikace a stanovení muskarinu	- 34 -
2.4.4 Identifikace a stanovení muscimolu, kyseliny ibotenové a muskarinu jednou metodou.....	- 35 -

2.4.5 Identifikace a stanovení kyseliny ibotenové, muskarinu, amatoxinů a falotoxinů jednou metodou	- 36 -
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 38 -
3.1 Použité chemikálie	- 38 -
3.2 Biologický materiál.....	- 38 -
3.3 Instrumentace a metody	- 38 -
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	- 43 -
4.1 Chromatografická separace a hmotnostně spektrometrická data standardů.....	- 43 -
4.1.1 MS spektrum standardu alfa-amanitinu.....	- 43 -
4.1.2 MS/MS spektra alfa-amanitinu a beta-amanitinu	- 44 -
4.1.3 MRM chromatogramy alfa-amanitinu a beta-amanitinu	- 44 -
4.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti	- 47 -
4.3 Matricový efekt	- 49 -
4.4 Opakovatelnost.....	- 51 -
4.5 Kalibrační křivky.....	- 51 -
4.6 Zvýšení návratnosti amatoxinů pomocí dipeptidu	- 52 -
4.7 Derivatizace dansyl-chloridem	- 54 -
4.8 Stanovení amatoxinů v reálných vzorcích	- 54 -
4.8.1 Stanovení amatoxinů v plodnici muchomůrky zelené	- 55 -
4.8.2 Stanovení amatoxinů v polévce	- 57 -
4.8.3 Stanovení amatoxinů v moči	- 59 -
4.7 Srovnání metody s metodami popsány v literatuře	- 59 -
5. ZÁVĚR.....	- 62 -
6. LITERATURA	- 63 -
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	- 67 -
8. SEZNAM OBRÁZKŮ	- 68 -
9. SEZNAM TABULEK.....	- 71 -

1. ÚVOD

Procházka po lese spojená se sběrem hub je velmi oblíbenou a široce rozšířenou volnočasovou aktivitou. Houby jsou pro mnohé lidi velmi chutným, levným a především také zdravým doplněním běžného jídelníčku. Česká republika je v houbaření a v oblibě hub na předních příčkách v porovnání s ostatními evropskými státy. Toto prvenství však přináší i nebezpečí vysokého výskytu otrav jedovatými houbami.

Otrava jedovatou houbou nemusí automaticky znamenat smrt a ve většině případů tomu tak naštěstí není. Otrava muchomůrkou červenou je většinou úmyslná a méně závažná. Otrava muchomůrkou zelenou je však mnohem nebezpečnější a v některých případech vede ke smrti. Její konzumace je většinou neúmyslná, jelikož lze tuto houbu velmi snadno zaměnit s jedlými typy hub. K vysokému počtu otrav muchomůrkami také přispívá velmi rozšířená pověra o hořké chuti těchto hub. Houbař si poté myslí, že při konzumaci jedovatou houbu rozpozná okamžitě. Bohužel chuť těchto hub se nijak výrazně neliší od chuti hub jedlých. Proto většinou není možné si během konzumace povšimnout přítomnosti jedovatých hub a včas tak zabránit otravě.

Při hospitalizaci pacienta podezřelého z otravy houbami je nezbytně nutné provést rychlé a jednoduché vyšetření s cílem zjistit přesnou příčinu otravy. Dřívější náročné mikroskopické metody zkoumání žaludečního obsahu se již nahrazují mnohem jednodušším a spolehlivějším vyšetřením. Pomocí metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí je možné velmi rychle a přesně stanovit, které toxiny jsou příčinou otravy a je tak možné rychle zahájit léčbu pacienta. Kromě metod kapalinové chromatografie byly popsány i metody další, o kterých pojednává teoretická část této práce. Nevýhodou instrumentálních metod stanovení toxinů je vysoká pořizovací cena potřebných přístrojů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Jedovaté houby

Houbaření je v České republice velmi oblíbenou volnočasovou aktivitou. S růstem počtu nasbíraných a následně zkonsumovaných hub bohužel také roste počet otrav houbovými toxiny. Některé otravy jsou méně závažné a způsobí „pouze“ krátkodobý pobyt v nemocnici. Jiné otravy jsou naopak velmi závažné. Mohou vést k poškození zdraví a v některých obzvláště závažných případech mohou končit i smrtí houbaře.

Některé jedovaté houby jsou na první pohled odlišitelné od hub jedlých. Otravy těmito houbami nejsou většinou náhodné. Jedná se spíše o úmyslnou intoxikaci lidí závislých na halucinogenních látkách. Jiné druhy jedovatých hub jsou naopak velmi podobné houbám jedlým. Intoxikace těmito houbami jsou ve většině případů náhodné. Při sběru hub dojde k neúmyslnému sběru jedovaté houby méně zkušeným houbařem. Proto je houbařům doporučováno sbírat jen takové druhy hub, které bezpečně a s jistotou poznají a u kterých nehrozí jejich záměna s jedovatým druhem houby.¹

Na světě existuje více než pět tisíc druhů hub. Přesný počet druhů hub není znám. Pouze 10 % ze všech druhů hub je pojmenovaných, naprostá většina druhů hub nemá jméno. Odhaduje se, že 10 – 15 % ze všech známých druhů hub je toxických.⁷

Je známo hodně rad a tipů, jak na první pohled rozeznat, zda se jedná o houbu jedlou či nejedlou. Žádná z těchto rad však nesmí být brána doslova. Univerzální pravidlo pro rozpoznání jedovatých hub od jedlých neexistuje. Pokud se houbař při sběru hub některým z pravidel absolutně a slepě řídí, velmi snadno může dojít k otravě. Jedno z pravidel je, že jedlá houba chutná dobře, zatímco jedovatá ne. Toto pravidlo neplatí například pro houby rodu *Amanitas*, které chutnají velmi dobře i přesto, že jsou smrtelné. Další radou pro poznání jedlé houby bývá uváděno ohlodání houby například veverkou, králíkem nebo slimákem. Tímto pravidlem však také není radno se řídit, jelikož například slimákům se velmi daří právě na houbách rodu *Amanitas*.¹⁹

Mezi nejrozšířenější jedovaté houby v českých lesích patří především muchomůrka červená a muchomůrka tygrovaná. Tyto houby způsobují méně závažnější otravy, jejichž příznaky většinou odezní do druhého dne bez nutnosti zásahu lékaře. Mnohem nebezpečnější jsou muchomůrka zelená, muchomůrka jarní, muchomůrka jízlivá a bedla chřapáčová. Toxiny těchto hub způsobují závažné otravy organismu, které vedou k poškození funkce jater. Při vyšší zkonsumované dávce a bez lékařské pomoci nastává úmrtí člověka po pěti až šesti dnech od intoxikace.

Otrava však může nastat i konzumací syrových hub, které jsou všeobecně považovány za houby jedlé. Jedná se především o houby jako je hřib satan, hřib koloděj, muchomůrka růžovka či václavky. Tyto houby obsahují termolabilní toxiny, jejichž struktura a tím i toxický účinek se teplem při vaření či smažení zruší. Hub, které jsou spolehlivě jedlé i v syrovém stavu je menšina.¹

Častým typem otrav jsou otravy muchomůrkou červenou a zelenou, proto se tato diplomová práce zaměřila na tyto dva druhy muchomůrek.

2.1.1 Muchomůrka červená

Muchomůrka červená (*Amanita muscaria*) má velmi nápadný vzhled. Má sytě červený klobouk posetý bílými tečkami. Klobouk je 10-15 cm široký. Váha je 60-70 gramů. Její pach je nevýrazný a chuť nasládlá. Muchomůrka červená patří k nejvíce rozšířenému druhu hub. Její výskyt je v oblasti celého mírného pásu od nížin až po vysoké hory. Muchomůrka červená je znázorněna na obr. 1.

Muchomůrka červená však dokáže žít pouze v symbióze s některými stromy. Nejvíce se vyskytuje s břízou, borovicí, smrkem a dubem. V České republice ji nalezneme především v období od srpna do listopadu.²

Obsahuje toxiny muscimol, muskarin a kyselinu ibotenovou. Především muscimol je psychoaktivní látka způsobující halucinace a poruchy vědomí. Proto byla muchomůrka červená v historii používána k navození stavů halucinace. Později se však zjistilo, že užívání muchomůrky červené vede k poškození zdraví a může vést až ke smrti.³



Obr. 1: Muchomůrka červená.

2.1.2 Muchomůrka zelená

Muchomůrka zelená je také nazývána muchomůrkou hlíznatou (*Amanita phalloides*). Je považována za nejjedovatější a nejnebezpečnější houbu Evropy a Severní Ameriky. Způsobuje nejvíce smrtelných otrav. Otrava muchomůrkou zelenou se liší od muchomůrky červené především tím, že se projeví až v okamžiku, kdy je již jed vstřebán do těla. V tomto okamžiku jsou již zasaženy životně důležité orgány, především játra. Její vzhled je nenápadný. Snadno může být zaměněna za holubinky či žampiony.

Průměr klobouku je 6-16 cm. Zbarvení klobouku může být od bíložluté, přes žlutozelenou až po žlutohnědou. Muchomůrka zelená nemá výraznou chuť ani vůni. Starší houby mají nasládlou vůni. Vyskytuje se v teplejších oblastech mírného pásu. Roste především v listnatých lesích v období od července do října. Doprovází hlavně duby a buky. Vzácněji se může vyskytovat také v borových lesích. Muchomůrka zelená je znázorněna na obr. 2.

Muchomůrka zelená obsahuje velké množství jedovatých cyklických alkaloidů. Toxiny se dělí do tří skupin a to na amatoxiny, falotoxiny a falolysiny. Mezi amatoxiny patří zejména alfa-amanitin, beta-amanitin a gama-amanitin. Dále obsahuje také epsilon-amanitin, amanin, amanin amid, amanulin, kyselinu amanulinovou a proamanulin. Kvantitativně je však nejvíce obsažen alfa-amanitin a beta-amanitin.

Udává se, že obsah amatoxinů dosahuje až 40 % celkového obsahu všech toxinů. Z falotoxinů jsou nejčetnější faloidin a falicidin.^{4, 9, 18}



Obr. 2: Muchomůrka zelená.

2.2 Houbové otravy

Na světě existuje velké množství jedovatých hub schopných intoxikovat lidský organismus. Dobrou zprávou je, že pouze malý zlomek z těchto hub je schopen způsobit velmi závažnou intoxikaci a případně i smrt člověka.

Symptomy otravy po konzumaci jídla z hub se u člověka mohou vyskytnout z různých důvodů. Jedním z důvodů je samozřejmě konzumace hub obsahujících toxiny. Nevolnost a příznaky otravy však může také způsobit konzumace velkého množství hub, které tělo obtížně zpracovává. Dalším důvodem negativní odpovědi těla na konzumaci hub může být imunologická reakce na antigeny pocházející z hub. Nebezpečná je také konzumace hub společně s příjmem alkoholu, jelikož některé druhy hub způsobují intoleranci těla vůči etanolu. Posledním a neméně častým důvodem objevení symptomů otravy po konzumaci hub je psychika člověka, který zkonzumoval nasbírané houby a není si jistý, zda byly všechny houby opravdu jedlé a neškodné. Člověk si strachem z otravy sám vsugeruje nevolnost, bolesti hlavy či bolesti břicha.

Diagnóza otravy je v současné době primárně založena na identifikaci hub ze zbytků jídla, mikroskopické analýze spor hub v žaludečním obsahu a chemické

analýze. Terapeutická strategie zahrnuje primární detoxifikaci a sekundární detoxifikaci. Při primární detoxifikaci se vyvolává zvracení, provádí se výplach žaludku a podává se aktivní uhlí, na které se nebezpečné látky adsorbují. Sekundární detoxifikace zahrnuje podání specifických antidot, které však nejsou za každé situace k dispozici.

Při otravě amatoxiny a falotoxiny dochází k postupnému selhání funkce jater. Úmrtnost je v tomto případě stále poměrně vysoká. Nadějí pro záchranu života je transplantace jater. Otravy ostatními toxiny naštěstí nejsou natolik závažné a prognóza je ve většině případů otrav velmi dobrá.⁵

V současné době se rozlišuje sedm rozdílných typů otrav jedovatými houbami, a to syndrom gastrointestinální, syndrom muskarinový, syndrom psilocybinový, syndrom mykoatropinový, syndrom faloidní, syndrom orellaninový a syndrom gyromitrinový.

2.2.1 Gastrointestinální syndrom

Hlavními příznaky jsou zvracení a průjem. Organismu hrozí dehydratace. Jedná se o nesourodou skupinu otrav. Doba latence je jedna až čtyři hodiny. Řada toxinů, způsobujících tento syndrom, nejsou známy. Gastrointestinální syndrom mohou vyvolat některé druhy žampionů a holubinek, hřib satan, čirůvka tygrovaná, závojenka jarní a mnoho dalších hub. Prognóza je ve většině případů dobrá.

2.2.2 Muskarinový syndrom

Při této otravě se objevují symptomy otravy jako je pocení, slinění, slzení, zvracení, průjmy, pokles krevního tlaku, poruchy vidění. Později se mohou objevit dýchací obtíže. Při vyšší požití dávce a bez zásahu lékařů hrozí smrt. Doba latence je maximálně dvě hodiny. Muskarinový syndrom je způsoben toxinem muskarinem. Způsobují jej především vláknice a strmělky. Při terapii se provádí výplach žaludku a podání atropinu. Prognóza závisí od požitého množství.

2.2.3 Psilocybinový syndrom (psychotropní)

Objevují se individuální psychické změny, především zrakové a sluchové halucinace, změny vnímání času a prostoru, střídání nálad. Dále dochází ke zrychlení tepu a zvýšení krevního tlaku. Příznaky kulminují 1,5 hodiny po požití a zcela mizí po 6 - 12 hodinách. Někdy se příznaky vracejí bez další konzumace houby (tzv. flash-back) i několik týdnů až měsíců po požití. Doba latence je 20-60 minut. Při terapii se používají sedativa, například diazepam. Syndrom způsobují lysohlávky, které obsahují toxiny psilocybin a psilocin. Prognóza je dobrá.

2.2.4 Mykoatropinový syndrom

Mezi symptomy patří nevolnost, zvracení, bolesti hlavy, bušení srdce, rozšířené zorničky. Objevují se také změny chování a halucinace. Příznaky obvykle vymizí do druhého dne. Doba latence je půl hodiny až tři hodiny. Mykoatropinový syndrom vyvolávají především muchomůrky červená a tygrovaná obsahující toxiny muscimol a kyselinu ibotenovou. Při terapii se používá žaludeční výplach a aktivní uhlí. Prognóza je relativně dobrá.

2.2.5 Faloidní syndrom

Faloidní typ otravy je nejzávažnější. Mezi symptomy patří zvracení a průjemy trvající až dva dny. Poté dochází k nevratnému poškození jater. Při vyšší dávce a bez lékařské pomoci nastává smrt po pěti až šesti dnech od intoxikace. Doba latence je 6 - 48 hodin. Faloidní syndrom způsobují amatoxiny (amanitin) a falotoxiny (faloidin) muchomůrky zelené a muchomůrky jarní.

Toxiny jsou vychytávány v játrech. Následně jsou vylučovány žlučí a poté kolují v enterohepatálním oběhu. Toxiny se v buňkách váží na enzym RNA polymerázu, která je nezbytná při procesu proteosyntézy. Toxiny RNA polymerázu inaktivují, čímž zastaví proteosyntézu. Buňka následně umírá po spotřebování již vytvořených proteinů.

Při terapii se vyvolává zvracení, provádí se výplach žaludku, podává se živočišné uhlí. Posledním řešením je transplantace jater. Prognóza je špatná. Přežití

je pouze u 10-20 % případů. Uvádí se, že až 85 % amatoxinů se vylučuje ledvinami v nezměněné podobě. Poškození ledvin je tedy spíše podmíněno dehydratací organismu.

2.2.6 Orellaninový syndrom

Prvotním symptomem je zvýšená tvorba moči. Později naopak snížená až zcela zastavená tvorba moči. Dále se objevuje sucho v ústech, bolesti žaludku a zvracení. Smrt může nastat následkem poškození ledvin. Doba latence je 2-17 dní. Syndrom způsobuje pavučinec plyšový obsahující toxin orellanin. Při terapii se provádí hemodialýza. Prognóza je špatná.

2.2.7 Gyromitrinový syndrom

Symptomy jsou opět nevolnost, bolesti hlavy a břicha, zvracení. Později dochází k selhání krevního oběhu, k otoku mozku a selhání jater. Doba latence je 5-10 hodin. Tento syndrom způsobuje ucháč obecný obsahující toxin gyromitrin. Při terapii se provádí výplach žaludku, podává se živočišné uhlí a intravenózně se aplikuje pyridoxin. Prognóza je nejistá.^{1, 5, 6}

2.3 Houbové toxiny

Jako houbové toxiny je označována velmi obsáhlá a různorodá skupina chemických látek obsažených v houbách, které po požití způsobují symptomy otravy vedoucí k méně či více závažnému ohrožení zdraví a života člověka.

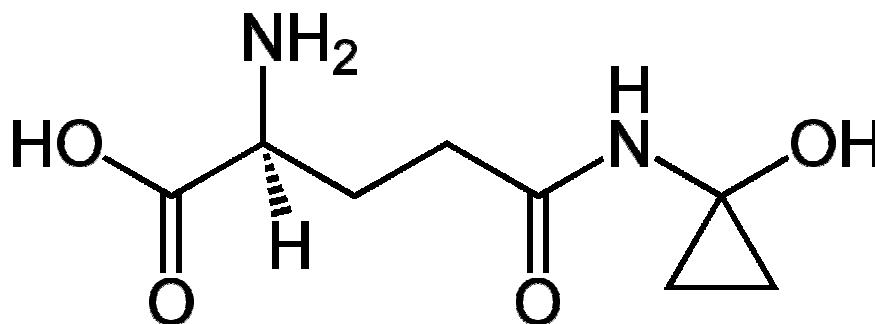
Struktury různých houbových toxinů jsou vysoce variabilní. Nejvíce toxické amanitiny mají unikátní strukturu bicycklického oktapeptidu. Amatoxiny mají molekulovou hmotnost kolem 900 Da. V čistém stavu tvoří bílé krystaly, které z deseti procent obsahují krystalově vázanou vodu. Jsou rozpustné ve vodě, v metanolu, v dimethylsulfoxidu a dimethylformamidu. Méně rozpustné jsou také v etanolu a vyšších alkoholech.

Nejsou rozpustné v méně polárních organických rozpouštědlech, jako jsou chloroform, diethylether a toluen. Tryptofanové jádro amanitinů substituované sírou absorbuje UV záření s maximem při vlnové délce 305 nm.²⁵

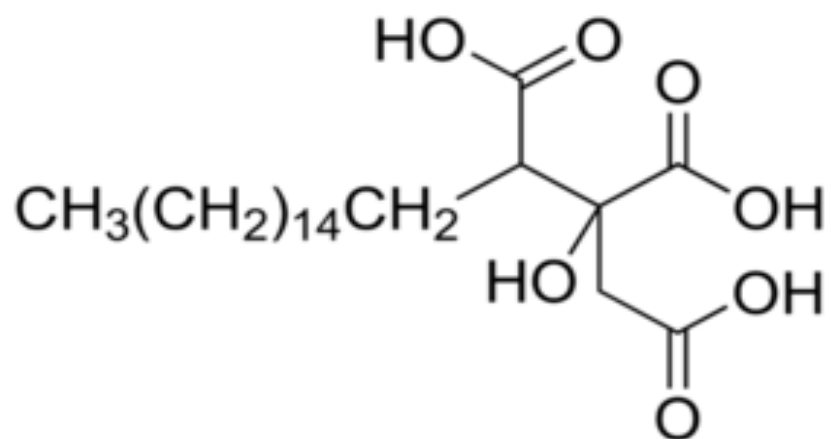
Falotoxiny mají strukturu podobnou struktuře amanitinů. Strukturně se jedná o bicycklé heptapeptidy. Falotoxiny se specificky váží na F-aktin a tím inhibují konverzi F-aktinu na G-aktin. Tím je narušena dynamická rovnováha mezi F a G formou aktinu, která je nezbytná pro život a správnou funkci buňky.¹⁷ Falotoxiny se však nevstřebávají z gastrointestinálního traktu. Proto při perorální otravě člověka nehrají významnou roli. Avšak při intravenózní či subkutánní (podkožní) aplikaci mají podobné účinky na buňky jako amanitiny.¹⁸

Menší toxicitu vykazují toxiny strukturně složené z aminokyselin jako jsou koprin, kyselina ibotenová či kyselina tricholomová, což je kyselina dihydroibotenová. Dále jsou známé toxiny strukturně odvozené od alkyl-kyselin. Příkladem je kyselina agarová. Tento typ toxinů vykazuje nízkou toxicitu. Další skupinou jsou toxiny tryptaminového typu. Mezi tyto toxiny patří bufotenin a psilocin, které jsou charakteristické svým halucinogenním efektem.⁷ V muchomůrce červené se vyskytuje ve větší míře také muskazol. Jedná se o isomer četnějšího a známějšího muscimolu.¹⁵

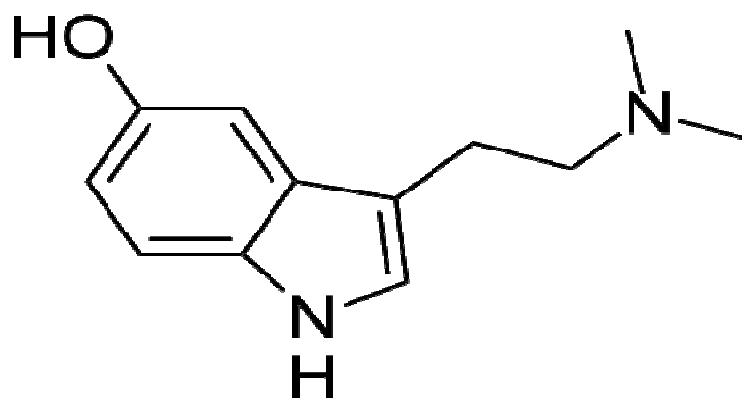
Struktury vybraných houbových toxinů jsou zobrazeny na obr. 3, 4, 5, 6 a 7.



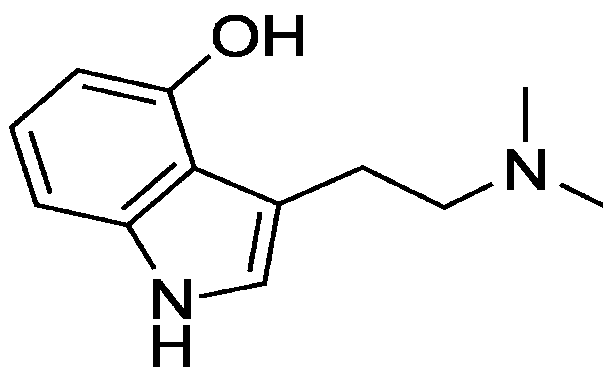
Obr. 3: Struktura koprinu.



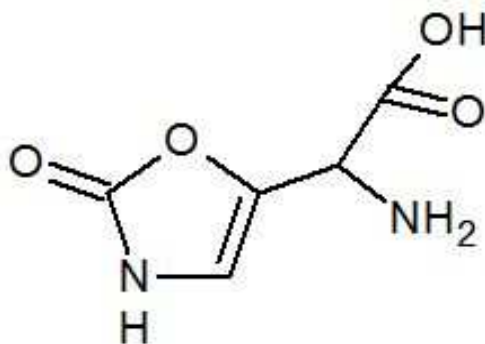
Obr. 4: Struktura kyseliny agarové.



Obr. 5: Struktura bufoteninu.



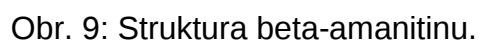
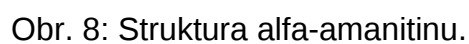
Obr. 6: Struktura psilocinu.



Obr. 7: Struktura muskazonu.

2.3.1 Alfa-amanitin a beta-amanitin

Alfa-amanitin i beta-amanitin jsou bezbarvé, někdy slabě nažloutlé krystalické látky. Vyskytují se v houbách rodu *Amanita*, jako je muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*), muchomůrka bílá (*Amanita alba*) a muchomůrka jízlivá (*Amanita virosa*). Alfa-amanitin a beta-amanitin jsou cyklické oktapeptidy, které obsahují několik netypických aminokyselin. Struktura alfa-amanitinu je znázorněna na obr. 8. Struktura beta-amanitinu je znázorněna na obr. 9. Molární hmotnost alfa-amanitinu je 918,978 g/mol. Molární hmotnost beta-amanitinu je 919,962 g/mol. Teplota tání obou amanitinů je 254-255°C. Jejich rozpustnost ve vodě je 1 g/l. ⁸



Alfa-amanitin je jedním z nejsilnějších jedů. Amanitiny poškozují jaterní buňky hepatocyty. LD₅₀ pro člověka je 0,1 mg/kg. Smrtelné dávky alfa-amanitinu pro různé živočichy jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1: Toxicita alfa-amanitinu pro různé živočichy při intraperitoneální aplikaci (do břišní dutiny). ²¹ (upraveno)

Předmět	LD ₅₀ mg/kg
Morče	0,05
Pes	0,15
Myš	0,2
Krysa	2
Žába	15
Bakterie	Nepůsobí
Člověk	0,1 (orálně)

Mechanismus otravy alfa-amanitinem byl poprvé popsán Stirpem a Fiumem v roce 1967.²⁰ Hlavní molekulární mechanismus toxicity alfa-amanitinu je silná inhibice RNA-polymerázy.⁹

Struktura RNA-polymerázy s navázaným alfa-amanitinem je znázorněna na obr. 10.

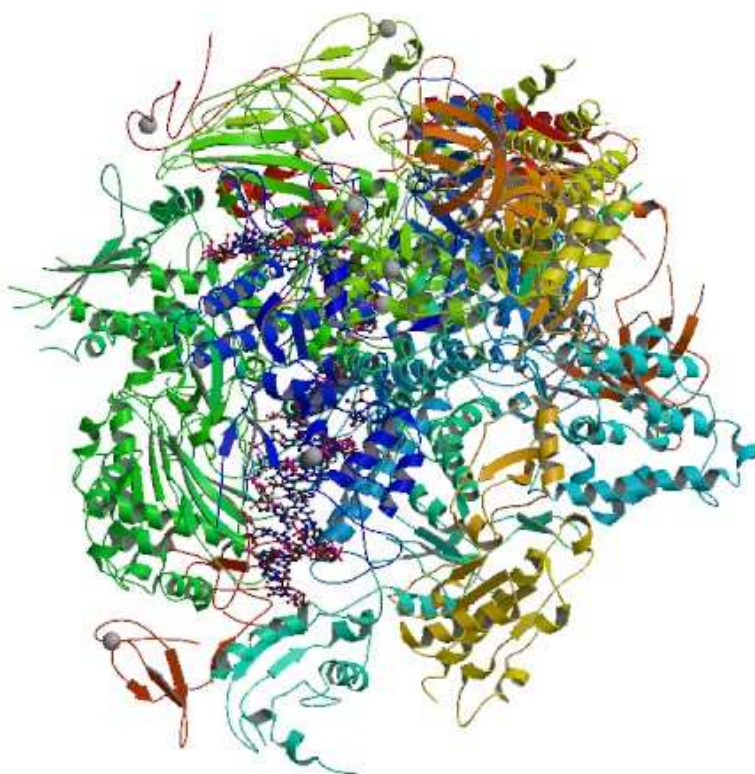
Toxiny se rychle absorbují z trávicího traktu, první příznaky se však projeví až po poškození většího počtu hepatocytů, což je většinou 8 - 48 hodin po konzumaci. V první fázi jde o nespecifické narušení funkcí trávicí soustavy. Na počátku této fáze má postižený celkové potíže jako je malátnost, nevolnost, závratě, bolest hlavy, mrazení. Poté se dostavují bolesti žaludku, prudké zvracení a silné průjmy, což vede k dehydrataci, demineralizaci a k oběhovému selhání. Právě oběhové selhání bývá příčina úmrtí především u dětí. Pokud pacient přežije, dojde k vymizení zvracení a průjmů.

Ve druhé fázi nastávají poruchy životně důležitých orgánů. Dochází k selhání jater a ledvin. Od čtvrtého až pátého dne se cítí pacient subjektivně lépe. Objektivně se zjišťuje zvětšení a zvýšená citlivost jater a polyurie. V lepších případech se nemocný uzdravuje. V těžších případech nastává akutní selhání jater nebo selhání funkce ledvin. Při velmi rychlém průběhu se nestačí rozvinout žloutenka a rozvíjí se

jaterní kóma, které se projevuje apatií, bezvědomím, neklidem, třesem, křečemi, tachykardií, hypotenzí, rozšířením zornic. Smrt nastává čtvrtý až sedmý den při rychlém průběhu otravy. Při pomalejším průběhu nastává smrt osmý až dvanáctý den otravy. Otrava je smrtelná až v 50 % případů.^{8, 12}

Vylučování amanitinů ledvinami je často neúčinné. Amanitiny, které prošly glomerulární filtrací, jsou částečně reabsorbovány zpět do krevního oběhu. Amanitiny tak mohou cirkulovat v krevním oběhu podstatně delší dobu, než ostatní nízkomolekulární látky, které nejsou reabsorbovány.²¹

Alfa-amanitin má však také své využití především v biochemických laboratořích. Využívá se při analýze RNA. Pomocí alfa-amanitinu byla například provedena studie vedoucí ke zjištění, jakým způsobem se RNA translokuje po inkorporaci nukleotidů.¹⁰



Obr. 10: Struktura elongačního aparátu RNA-polymerázy s navázaným alfa-amanitinem. Alfa-amanitin je znázorněn fialovou barvou.¹⁰

Toxický účinek amanitinů je možné také využít. Jak již bylo uvedeno, alfa-amanitin blokuje funkci enzymu RNAP II. Tento enzym se nachází v eukaryotických buňkách. Alfa-amanitin je tedy využitelný jako protiparazitické a protiplísňové léčivo. Může být externě použit proti ektoparazitům. Byl vyšetřován toxický účinek alfa-amanitinu na laboratorní myši při intraperitoneální aplikaci (aplikace přímo do dutiny břišní) a při aplikaci perkutánní (přes kůži). Byl použit roztok alfa-amanitinu o koncentraci 1mg/kg. K určení množství toxinu v kůži, v ledvinách a v játrech byla použita metoda HPLC. Ve skupině myší, kterým byl alfa-amanitin podán perkutánně nebyl stanoven. Ve skupině myší, kterým byl toxin podán intraperitoneálně však alfa-amanitin stanoven byl. Výsledky experimentu ukázaly, že alfa-amanitin nebyl absorbován přes kůži myší a tedy, že perkutánní aplikace toxinu nemá žádný toxický účinek na organismus. Alfa-amanitin podávaný perkutánní aplikací může být použit pro terapeutické účely.¹¹

Získat amatoxiny je velmi obtížné. Houby rodu *Amanita* je obvykle problematické vypěstovat. Rostou velmi pomalu a produkují buď velmi málo nebo dokonce žádné amatoxiny. Nejeefektivnější a nejlevnější způsob, jak získat amatoxiny, je nasbírat houby rodu *Amanita* v jejich přirozeném prostředí a amatoxiny následně extrahovat a purifikovat.¹⁷

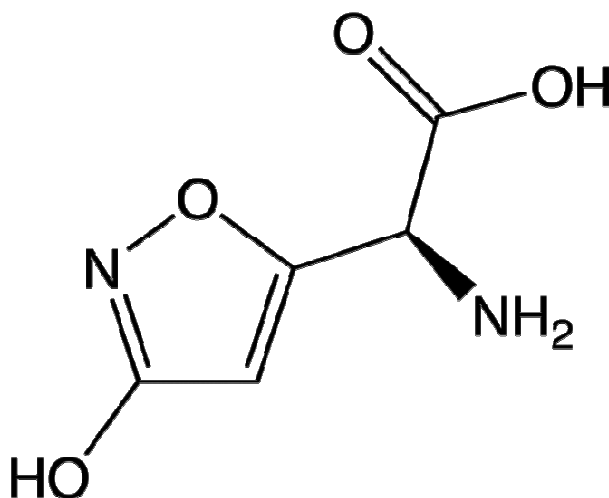
2.3.2 Kyselina ibotenová

Kyselina ibotenová je chemická sloučenina přirozeně se vyskytující především v muchomůrce červené a v muchomůrce tygrované. Jedná se o toxin velmi podobný neurotransmiteru kyselině glutamové. Díky této podobnosti ve struktuře má kyselina ibotenová silné neurotoxické účinky. Po požití je rychle vstřebána z gastrointestinálního traktu. Kyselina ibotenová je následně transportována přes hematoencefalickou bariéru aktivním transportním mechanismem. Působí primárně na CNS, kde se chová jako agonista přirozeného neurotransmiteru. Kyselina ibotenová tak napodobuje kyselinu glutamovou a silněji se váže na NMDA receptor. První symptomy se objevují po 120 minutách. Dochází k útlumu CNS. Pacient je otupělý, objevují se náboženské halucinace a hyperkinetické chování. Otrava většinou nevyústí v poškození životně důležitých orgánů.^{13, 14}

Prahová hodnota koncentrace kyseliny ibotenové pro pozorování poruch CNS je 30-60 mg. Tato dávka je dostupná v jedné houbě *Amanita muscaria* nebo *Amanita pantheria*.²³

Struktura kyseliny ibotenové je znázorněna na obr. 11. Její molární hmotnost je 158,11 g/mol. Teplota tání je 151-152° C. Je dobře rozpustná ve studené vodě a v metanolu.^{13,14} Průměrný obsah kyseliny ibotenové v muchomůrce červené byl stanoven na 100 ppm čerstvé hmoty.¹⁶

U člověka je podstatná část kyseliny ibotenové vyloučena v nezměněné podobě močí. Pokud je požitá kyselina ibotenová, tak prakticky nedochází k vylučování muscimolu. Ale po konzumaci *Amanita muscaria*, která obsahuje kyselinu ibotenovou i muscimol, byl muscimol v moči detekován. Kyselina ibotenová je vylučována tělem velmi rychle a to po 20-90 minutách od konzumace. Nejvíce symptomů otravy se objevuje po 30-90 minutách od konzumace. Symptomy dosahují své největší intenzity v okamžiku, kdy je většina zkonsumované kyseliny ibotenové vyloučena.²⁴

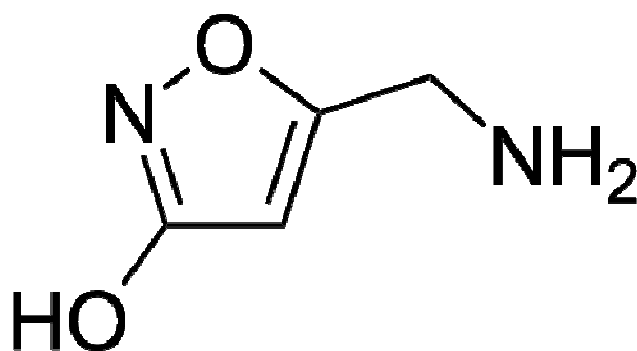


Obr. 11: Struktura kyseliny ibotenové.

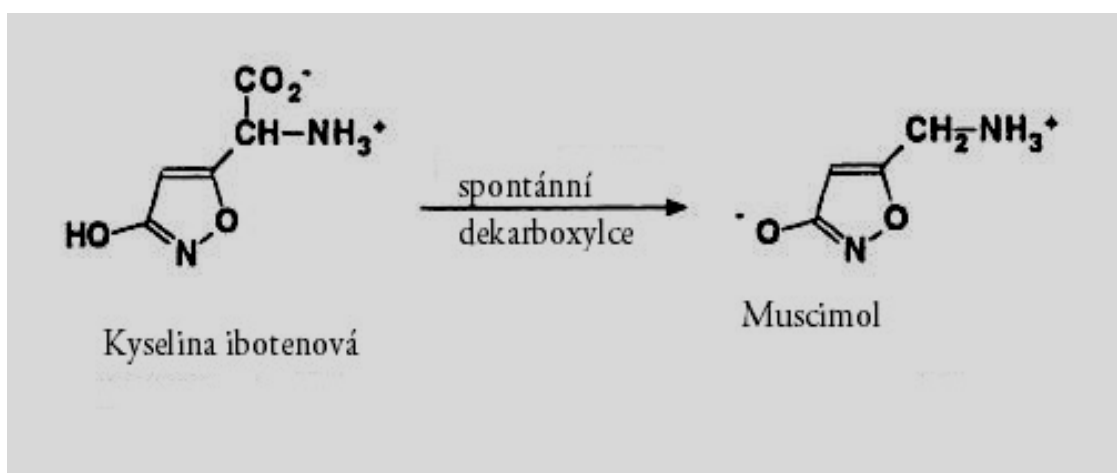
2.3.3 Muscimol

Muscimol doprovází kyselinu ibotenovou v muchomůrce červené i muchomůrce tygrované. Oba toxiny byly poprvé izolovány ve Švýcarsku, Anglii a Japonsku během let 1960-1964. Muscimol je strukturním derivátem GABA. Struktura muscimolu je znázorněna na obr. 12. Muscimol může vznikat spontánní dekarboxylací kyseliny ibotenové. Stejným způsobem – dekarboxylací – vzniká také GABA z kyseliny glutamové. Tato dekarboxylace však neprobíhá spontánně, ale za účasti enzymu glutamátdekarboxylasy.²²

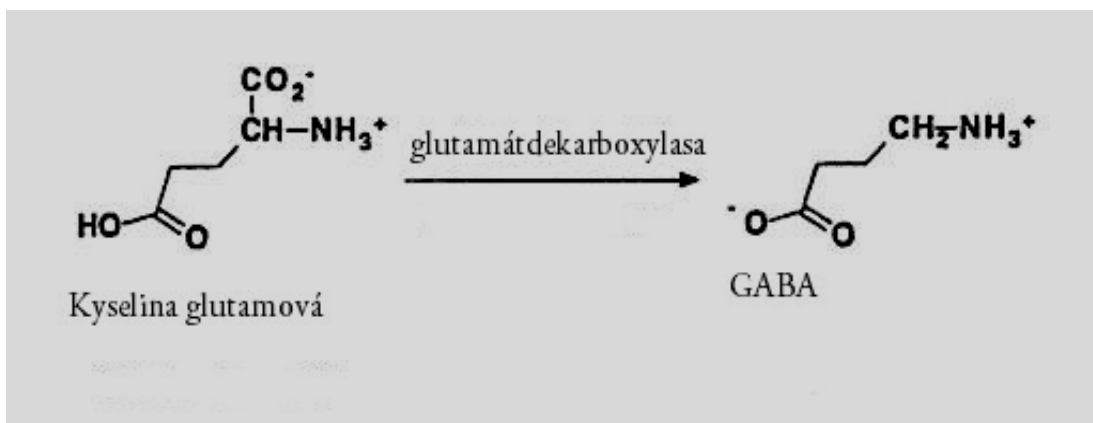
Obě zmíněné dekarboxylace jsou znázorněny na obr. 13 a 14.



Obr. 12: Struktura muscimolu.



Obr. 13: Spontánní dekarboxylace kyseliny ibotenové na muscimol.



Obr. 14: Enzymatická dekarboxylace kyseliny glutamové na GABA.

Muscimol, stejně jako kyselina ibotenová, působí na CNS. Evokuje halucinace, delirium, svalové křeče. Muscimol napodobuje přirozený neurotransmiter GABA, váže se na receptor mnohem silněji a vykazuje tak výrazný efekt na CNS. Prahová hodnota množství muscimolu pro pozorování příznaků poruch CNS je 6 mg.²³

Většina muscimolu, který je absorbován do krevního řečiště myší, je vyloučen močí do šesti hodin od intraperitoneální aplikace. Jedna třetina je vyloučena v podobě muscimolu, jedna třetina v podobě kationtového konjugátu a jedna třetina v podobě oxidačního produktu.²⁴

Obsah muscimolu v muchomůrce červené byl stanoven na méně než 3 ppm čerstvé hmoty.¹⁶

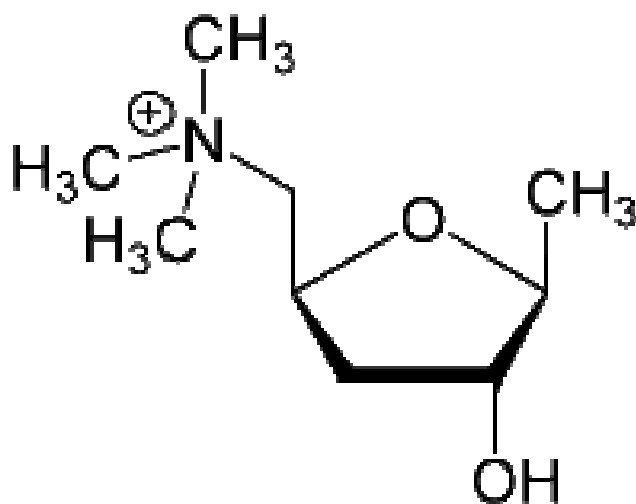
2.3.4 Muskarin

Muskarin byl poprvé izolován roku 1869 z muchomůrky červené. Dlouho byl považován za hlavní aktivní látku těchto hub. Strukturně se jedná o polární, hydrofilní kvartérní amoniovou sůl s důležitou biologickou aktivitou.

Muskarin působí na tu část periferního nervového systému, která využívá acetylcholin jako mediátor na postgangliovém zakončení parasympatických vláken.¹⁸ Muskarin se váže na muskarinové acetylcholinové receptory. Tyto receptory jsou aktivovány právě muskarinem. V těle se vyskytuje mnoho muskarinových receptorů, které na podráždění acetylcholinem reagují kontrakcí svalového vlákna. Muskarinový

receptor zpomaluje frekvenci srdečních stahů, podporuje činnost žláz s vnitřní i vnější sekrecí a ovlivňuje stahy hladké svaloviny v cévách a v močovém a dýchacím systému. Muskarinové receptory M3R byly odhaleny na některých buňkách tlustého střeva. Tyto receptory spouštějí v jádře rychlejší dělení buněk. Mají-li tkáň tlustého střeva větší náchylnost ke vzniku novotvarů (genetická dispozice, kouření, častá konzumace uzenin), může acetylcholin spustit nežádoucí proliferaci rakovinných buněk.^{26, 27, 28}

Symptomy otravy zahrnují především nejasné vidění, zvýšené slinění, zpomalení srdeční činnosti.¹⁸ Struktura muskarinu je znázorněna na obr. 15.



Obr. 15: Struktura muskarinu.

2.4 Identifikace a stanovení houbových toxinů

2.4.1 Identifikace a stanovení alfa a beta-amanitinu

Pro identifikaci a stanovení alfa a beta-amanitinu bylo vyvinuto mnoho metod a technik. Tyto metody se liší kvalitou separace analytů, nejmenším množstvím, které lze danou metodou stanovit a v neposlední řadě také cenou analýzy. Například vysokoúčinné kapalinové chromatografy s hmotnostní detekcí jsou poměrně drahé přístroje a nejsou tak dostupné v každé laboratoři.

Dříve byla častou metodou stanovení amanitinů metoda RIA. Amanitiny byly značeny pomocí isotopu jodu ¹²⁵I, který má však krátký poločas rozpadu.^{34, 35}

Homann et al. detekovali amanitiny v moči 15-letého chlapce, který se pokusil o sebevraždu konzumací jedovatých hub, metodou RIA. Amanitiny byly detekovány již 90 minut po požití hub v žaludeční tekutině a v moči. Takto brzká detekce toxinů je důkazem jejich rychlé absorpce z intestinálního traktu a následné extrakce ledvinami.³⁶

Mezi nejlevnější a nejjednodušší metody stanovení patří metoda TLC. Již v roce 1965 byly alfa, beta i gama-amanitin stanoveny tenkovrstevnou chromatografií na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit roztok methyl-ethylketon:metanol (1:1). Tato metoda poskytla velmi účinnou separaci vybraných toxinů. Chromatografická separace ve směsi *n*-butanol:kyselina octová: voda (4:1:1) byla méně úspěšná, ale retenční faktory toxinů byly stejné jako v případě první výše zmíněné separace.^{29, 30}

Tab. 2: TLC amanitinů extrahovaných z *Amanita phalloides* a z *Galeria marginata*³⁰ (upraveno).

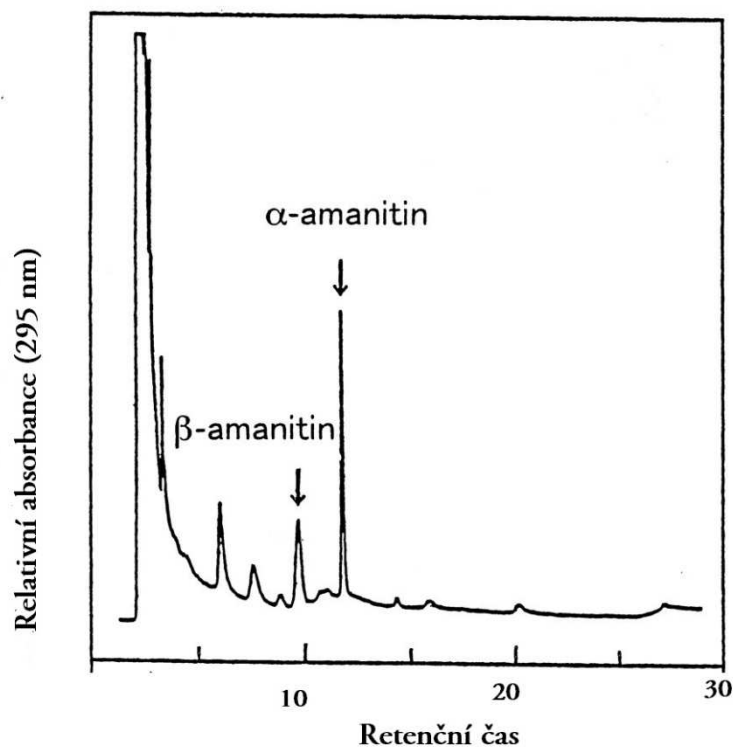
	MF 1				MF 2	
	<i>A. phalloides</i>		<i>G. marginata</i>		<i>A. phalloides</i>	<i>G. marginata</i>
Toxin	R _f	C _{rel}	R _f	C _{rel}	R _f	R _f
α-amanitin	0,20	+++	0,18	Stopy	0,17	0,17
β-amanitin	0,38	+++	0,36	+++	0,20	0,19
γ-amanitin	0,51	stopy	0,48	++	0,27	0,27

MF 1 = methyl-ethylketon:metanol (1:1)

MF 2 = *n*-butanol:kyselina octová: voda (4:1:1)

C_{rel} = relativní koncentrace

Struktura amanitinů obsahuje aromatické jádro, což se dá využít pro UV detekci těchto látek. Muraoka et al. stanovili alfa a beta-amanitin za použití RP-HPLC. Použili gradientovou eluci. Toxiny byly detekovány za použití detektoru diodového pole. Byly sledovány vlnové délky v oblasti 210 až 500 nm.³¹ Chromatogram amanitinů s UV detekcí ukazuje obr. 16.

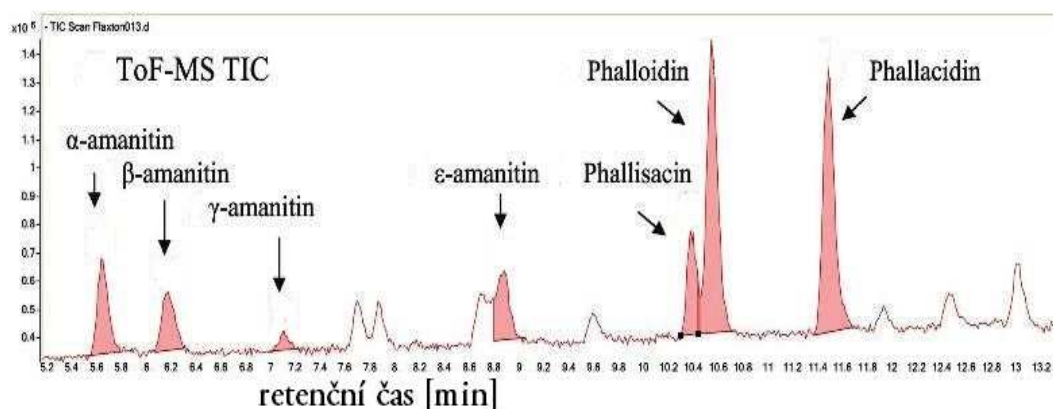


Obr. 16: Chromatogram intracelulárního alfa a beta-amanitinu izolovaného z *Galeria helvoliceps*.³¹ (upraveno)

Metodu RP-HPLC s UV detekcí pro identifikaci a kvantifikaci alfa a beta-amanitinu vytvořili také Jehl et. al. Použili isokratickou eluci a spektra zaznamenávali při vlnové délce 280 nm. Tato metoda vykazovala LOD 10 ng/ml pro oba toxiny.³²

Cenově náročnější analýza je při spojení chromatografie s hmotnostní detekcí. Clarke et al. stanovovali amatoxiny z *A. phalloides* pomocí HPLC-UV-TOF/MS. Tato metoda byla rychle zavedena pro detekci amatoxinů a falotoxinů pomocí chromatografie s TOF analyzátozem a UV technikou pro semikvantitativní analýzu. Bylo zjištěno, že druhy hub *A. muscaria*, *A. rubescens* a *A. citrina* obsahují méně než 1 mg/kg amatoxinů a falotoxinů. Proto také tyto druhy hub nezpůsobují smrtelné

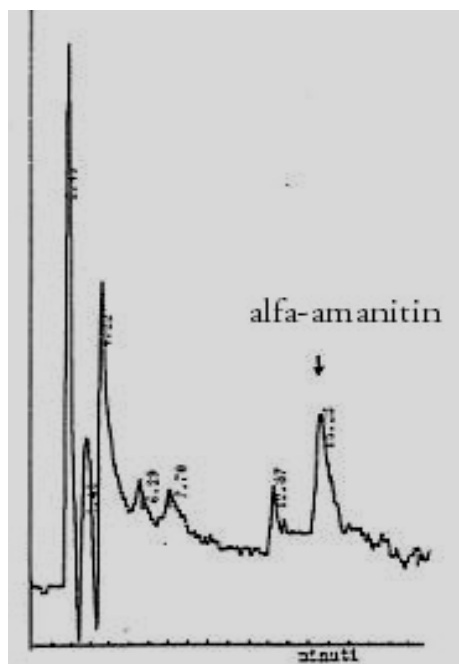
otravy.³³ Na obr. 17 je ukázka chromatogramu z TOF/MS analýzy toxinů z *A. phalloides*.



Obr. 17: Chromatogram extraktu z *A. phalloides*.³³ (upraveno)

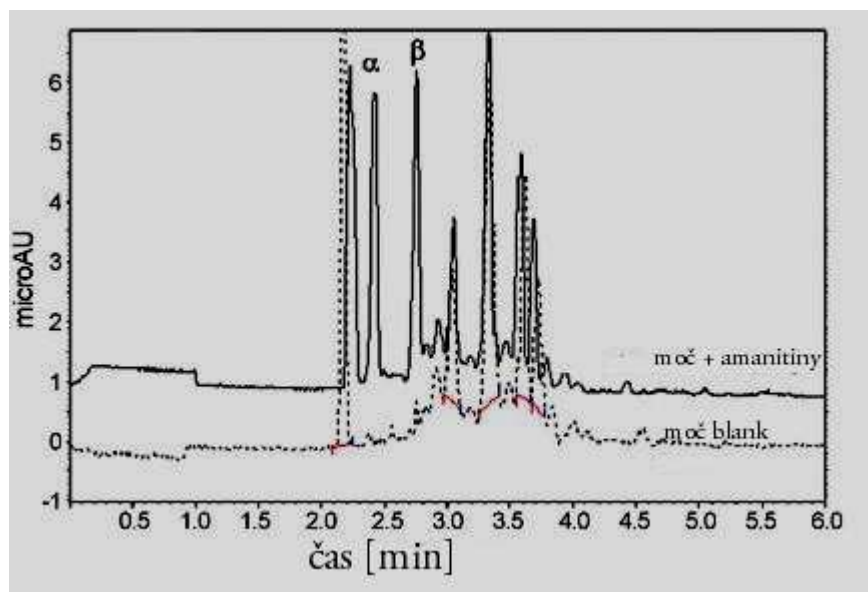
Maurer et al. vyvinuli LC/ESI-MS metodu pro stanovení alfa a beta-amanitinu v moči. Toxiny byly analyzovány jednak po SPE extrakci a jednak po IAE extrakci. Jako mobilní fáze byla použita směs metanol:octan amonný (70:30). Touto metodou bylo dosaženo LOD 2,5 ng/ml a LOQ 5 ng/ml.³⁷

Amatoxiny je možné také detekovat elektrochemicky, jak vyplývá z práce Defendenti et al. Vyvinuli a validovali LC metodu s elektrochemickou detekcí pro stanovení alfa-amanitinu v moči. Extrakty byly separovány isokraticky na reverzní fázi C18. Mobilní fáze byla složena z 0,005 M fosfátového pufru *pH* 7,2 a acetonitrilu (90:10). Coulometrická detekce bylo provedena vložím oxidačního potenciálu 500 mV na porézní uhlíkovou elektrodu. Touto metodou bylo stanoveno až 10 ng/ml alfa-amanitinu.³⁸ Chromatogram vzorku moči je zobrazen na obr. 18.



Obr. 18: Chromatogram vzorku moči intoxikované osoby obsahující 28 ng/ml alfa-amanitinu. ³⁸ (upraveno)

Další možností stanovení amatoxinů je využití elektroforézy. Kapilární zónovou elektroforézou stanovili alfa a beta-amanitin například Robinson-Fuentes et al. Toxiny byly detekovány v moči a celá analýza trvala méně než 7 minut. Jako elektrolyt byl použit 0,01 M borátový pufr *pH* 10. Toxiny byly detekovány pomocí PDA detektoru při vlnové délce 214 nm. Tato metoda dosáhla hodnoty 1,5 ng/ml LOD a 5 ng/ml LOQ. ³⁴ Elektroforegram alfa a beta-amanitinu je znázorněn na obr. 19.



Obr. 19: Elektroforegram moči (blanku) a moči spikované alfa a beta-amanitinem.³⁴ (upraveno)

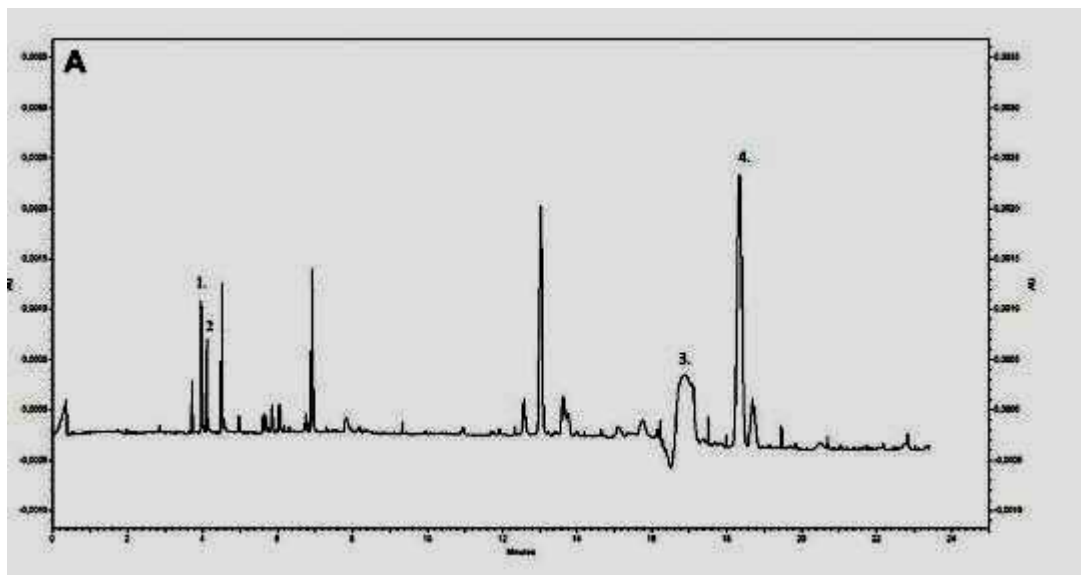
Ačkoli existuje velké množství metod, které mohou být použity ke stanovení amanitinů v biologických vzorcích, je nutné si uvědomit, že každá metoda má své nedostatky. LC-MS instrumentace nejsou dostupné v každé laboratoři a ne všechny metody naplňují požadavky na citlivost, přesnost, specifickou, jednoduchost provedení a časovou nenáročnost. Některé metody používají při analýze toxické látky, jako je například ethidium bromid. Tato látka je použita v práci Vlaskina et al. Byla použita interakce ethidium bromidu a amanitinu na stanovení amanitinu pomocí fluorescence.^{34, 39}

2.4.2 Identifikace a stanovení muscimolu a kyseliny ibotenové

Navzdory mnoha studiím, které se věnují analýze halucinogenních látek, které mohou být identifikovány v tělních tekutinách, je zde potřeba velmi rychlé a nízkonákladové metody pro stanovení nejrůznějších látek. Toto téma je o to důležitější, jak roste popularita halucinogenních hub a jak je snadný přístup k těmto přírodním a nezakázaným stimulantům.⁴⁰

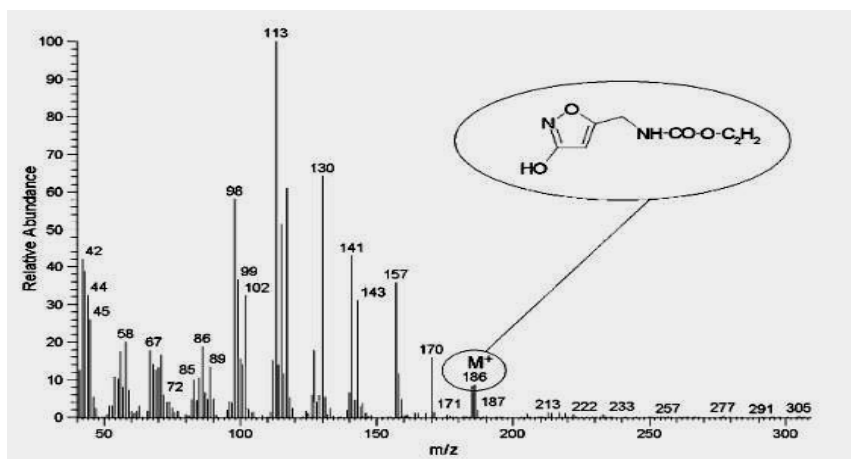
Poliwoda et al. stanovili muscimol a kyselinu ibotenovou pomocí kapilární elektroforézy. Jako elektrolyt byl použit 25 mM fosfátový pufr *pH* 3 s 5% obsahem ACN (v/v).

Muscimol a kyselina ibotenová byly identifikovány pomocí UV spektra a migračních časů. Byl přidán vnější standard. Na obr. 20 je znázorněn elektroforegram extraktu s přidavkem vnějšího standardu. LOD pro muscimol byl 1,8 µg/ml a pro kyselinu ibotenovou 1,5 µg/ml. ⁴¹

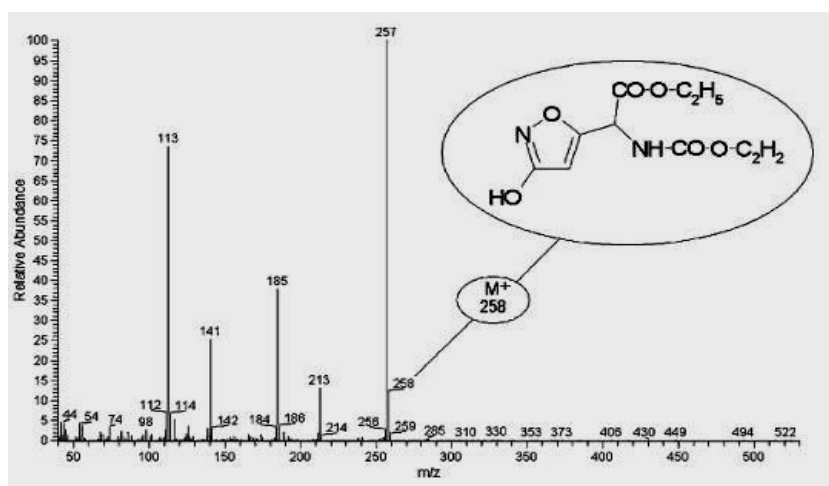


Obr. 20: Elektroforegram extraktu z *A. muscaria* s přidavkem vnějšího standardu. Detekce UV při 214 nm. Pík 1 je muscimol, pík 2 je vnější standard, pík 3 je EOF a pík 4 je kyselina ibotenová. ⁴¹

Po derivatizaci je možné tyto analyty stanovit také metodou GC/MS, kterou popsali Stříbrný et al. Pro extrakci alkaloidů z moče byl použit silný katex (Dowex 50). Eluce a derivatizace byla provedena v jednom kroku a to použitím ethyl-chlormravečnanu ve vodném roztoku hydroxidu sodného s přidavkem etanolu a pyridinu. Jako vnitřní standard byl použit cykloserin. Celkový čas analýzy byl 20 minut. Hmotnostní spektra muscimolu a kyseliny ibotenové jsou zobrazena na obr. 21 a 22. Tato metoda poskytla LOD pro oba analyty 1 µg/ml. ⁴²



Obr. 21: Hmotnostní spektrum derivatizovaného muscimolu. ⁴²

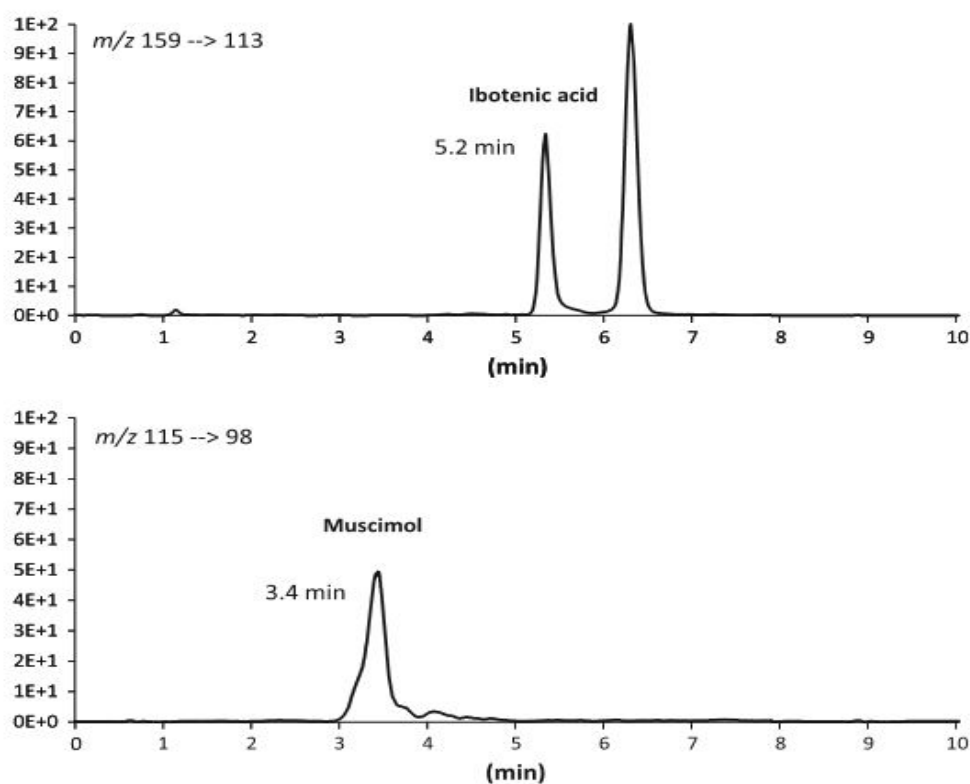


Obr. 22.: Hmotnostní spektrum derivatizované kyseliny ibotenové. ⁴²

Muscimol a kyselina ibotenová byly stanoveny také použitím iontově-výměnné chromatografie. Jako stacionární fáze byla použita C18 reverzní fáze. Mobilní fází byl vodný roztok 5 mM octyl-amonium fosfátu. UV-spektrofotometrická detekce byla provedena při 230 a 254 nm. Detekční limit byl 18 µg/ml pro kyselinu ibotenovou a 30 µg/ml pro muscimol. ⁴³

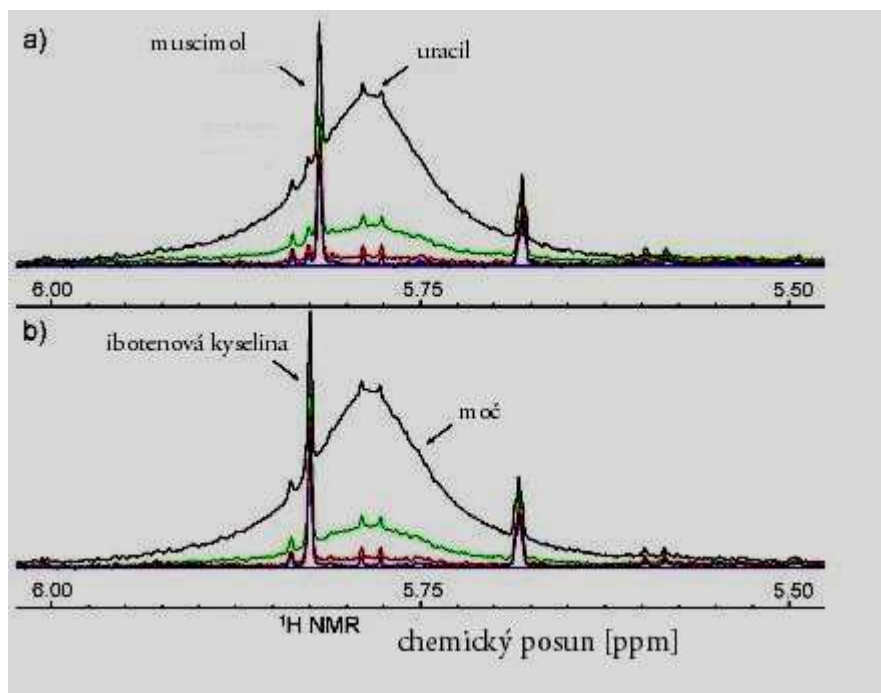
Byla popsána metoda tandemové hmotnostní spektrometrie LC-MS/MS. Byla použita gradientová eluce, kde jako složka A mobilní fáze byla použita 0,5% kyselina mravenčí a jako složka B byl použit ACN s obsahem 0,5% kyseliny mravenčí.

Chromatogramy pro ibotenovou kyselinu a muscimol jsou znázorněny na obr. 23.⁴⁴



Obr. 23: Chromatogramy pro ibotenovou kyselinu a muscimol ze vzorku séra intoxikovaných pacientů.⁴⁴

Primárně používanou metodou pro detekci muscimolu a kyseliny ibotenové je hmotnostní spektrometrie. Důležité jsou však i speciální metody detekce. Nedávno publikovanou metodou je NMR metoda stanovení muscimolu a kyseliny ibotenové v moči. Pomocí NMR lze detekovat přibližně 40 různých látek v lidské moči. Byla použita ^1H NMR spektroskopie při protonové frekvenci 58 MHz. Signál NH protonů moče a protonů vody potlačoval signály analytů. Z tohoto důvodu byla provedena optimalizace času míchání (důležitý parametr v 1D-NOESY NMR experimentu, který byl použit), kdy byl hledán takový čas, při kterém dojde k největšímu zeslabení signálu moče a vody. Tento čas byl stanoven na 600 ms. Na obr. 24 je znázorněn vliv času míchání na zeslabení signálu moče. Mez detekce pro muscimol byla 13 $\mu\text{g/ml}$ a pro kyseliny ibotenovou 30 $\mu\text{g/ml}$.⁴⁰



Obr. 24: Vliv zvyšování času míchání na zeslabení signálu moči pro (a) muscimol (singlet při 5,86 ppm) a pro (b) kyselinu ibotenovou (singlet při 5,88 ppm)⁴⁰ (upraveno)

2.4.3 Identifikace a stanovení muskarinu

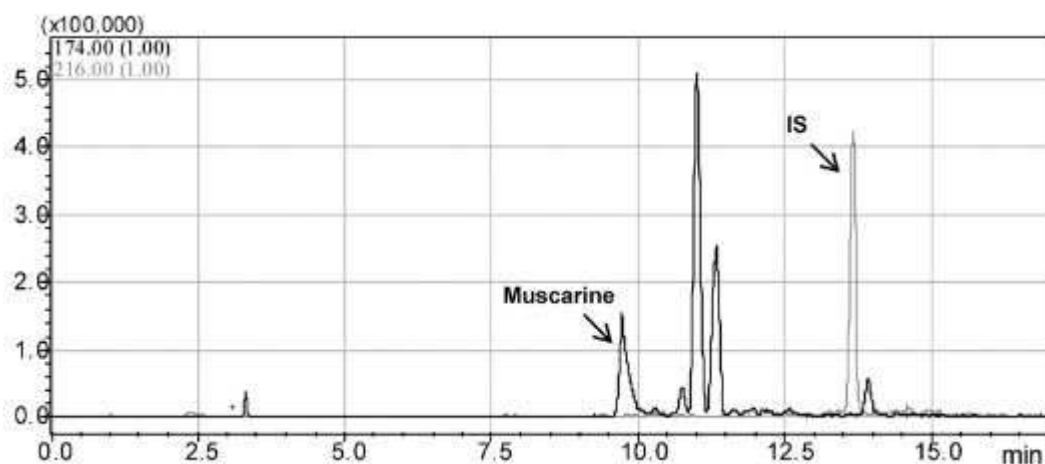
Již v roce 1969 byl muskarin identifikován a stanoven metodou plynové chromatografie.⁴⁵

V roce 1981 Stijve popsal stanovení muskarinu z druhů *Inocybe* a *Clitocybe*. Metanolický extrakt těchto hub byl analyzován vysokoúčinnou tenkovrstevnou chromatografií. Pro detekci bylo použito modifikované Dragendorfovo činidlo. Muskarin byl detekován jako oranžová stopa s retenčním faktorem 0,55.⁴⁶

Brown et al. publikovali stanovení muskarinu pomocí papírové chromatografie, kde bylo pro detekci muskarinu použito Thiesovo a Reuthersovo činidlo.⁴⁷

Muskarin v moči byl stanoven také metodou LC/MS. Metoda zahrnuje SPE extrakci muskarinu z moči za použití kolonky Strata X-CW. Separace muskarinu bylo dosaženo v čase 16 minut na reverzní fázi Gemini C18. Mobilní fáze se skládala z vodného roztoku kyseliny heptafluormásečné a z acetonitrilu. Byla použita gradientová eluce. Detekována byla hmota m/z 174 pro muskarin a hmota m/z 216 pro acetylovaný muskarin jako vnitřní standard. Dosažené LOD a LOQ byly touto

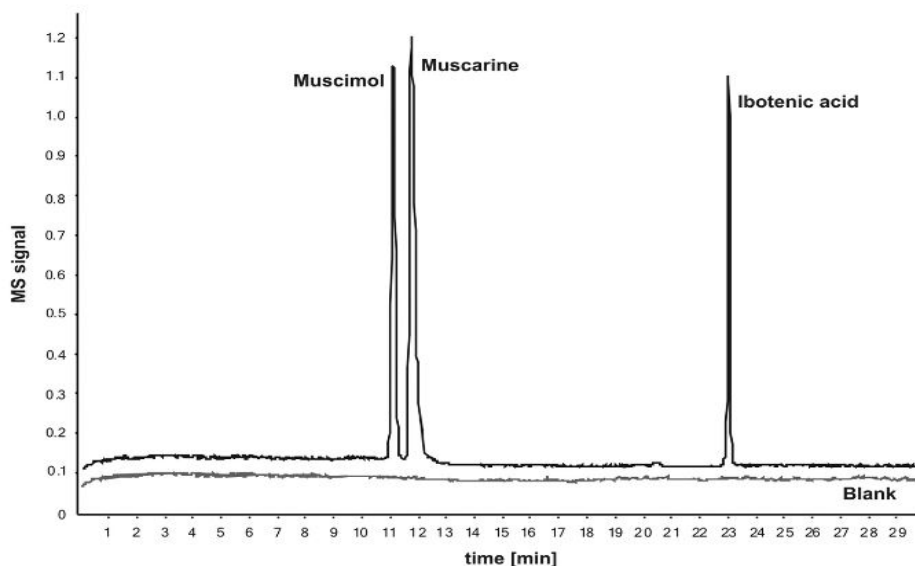
metodou velmi nízké. LOD bylo 0,09 ng/ml a LOQ bylo 0,3 ng/ml. Chromatogram muskarinu izolovaný z pacientovy moči je na obr. 25.⁴⁸



Obr. 25: LC/MS analýza pacientovy moči.⁴⁸

2.4.4 Identifikace a stanovení muscimolu, kyseliny ibotenové a muskarinu jednou metodou

Simultánní stanovení muscimolu, kyseliny ibotenové a muskarinu bylo prozatím popsáno dvěma metodami. První metodou je kapilární elektroforéza s hmotnostním detektorem (CE-ESI-MS/MS). Hmotnostní detektor byl vybaven trojitým kvadrupólovým analyzátozem. Všechny tři houbové toxiny byly separovány během 24 minut a dosahovaly LOD v řádu nanomolů. Napětí pro separaci bylo nastaveno na 27 kV. Elektroforegram studovaných analytů je znázorněn na obr. 26.⁴⁹



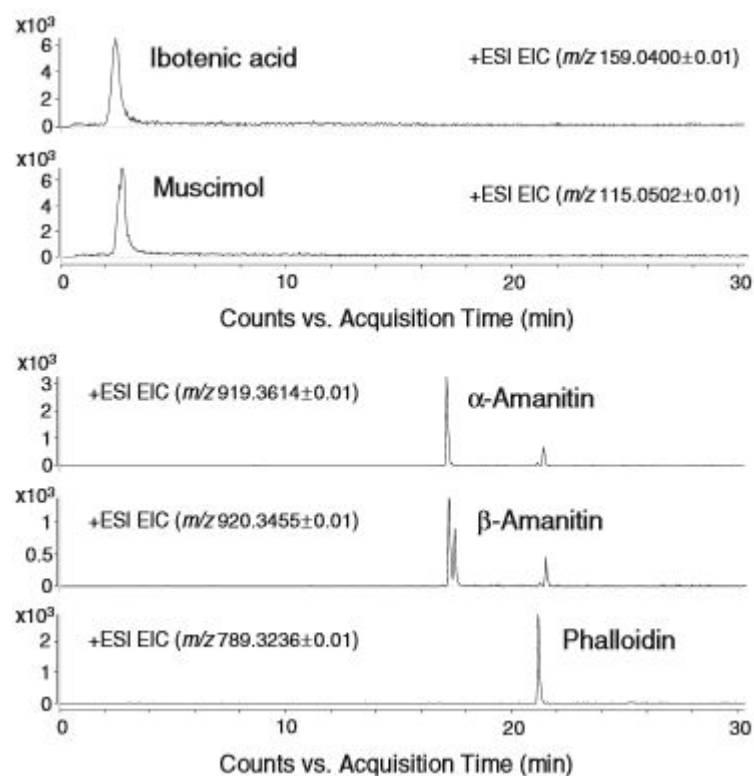
Obr. 26: Elektroforegram (MRM mód) studovaných analytů. Koncentrace muscimolu a kyseliny ibotenové je 50 ng/ml a muskarinu 500 ng/ml. Blank je deionizovaná voda. ⁴⁹

Druhá studie se zabývá stanovením kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu metodou kapalinové chromatografie (LC-MS). Extrakce analytů byla provedena pomocí Strata X-CW a Discovery SCX SPE kolonek. Separace byla provedena na koloně Gemini C18 (150 mm x 2 mm; 5 μ m). Jako mobilní fáze byla použita 8 mM heptafluormásečná kyselina. Retenční čas pro kyselinu ibotenovou byl 2,6 minuty, pro muscimol 4,6 minuty a pro muskarin 14,2 minuty. LOD dosažené touto metodou byly 50 ng/ml pro kyselinu ibotenovou, 40 ng/ml pro muscimol a 3 ng/ml pro muskarin. ⁵⁰

2.4.5 Identifikace a stanovení kyseliny ibotenové, muskarinu, amatoxinů a falotoxinů jednou metodou

Na stanovení muscimolu, kyseliny ibotenové, muskarinu, alfa a beta-amanitinu, faloidinu a falacidinu byla vyvinuta jednoduchá a rychlá metoda LC-TOF-MS. Toxiny byly extrahovány 0,5% kyselinou mravenčí v roztoku metanolu a vody a purifikovány na Oasis HLB kolonkách. Separace probíhala na pentafluorfenylpropylové koloně. Mobilní fáze byla složena z 0,1% kyseliny mravenčí a metanolu. Hmotnostní spektra byla měřena v pozitivním módu. Látky byly

ionizovány elektrosprejem. Detekční limity toxinů ve vzorcích hub byly v rozmezí 0,0098 – 4,9 µg/ml. Metoda je tedy dostatečně citlivá pro vyšetřování případů souvisejících s otravami z jídla. Chromatogramy extrahovaných analytů jsou znázorněny na obr. 27.⁵¹



Obr. 27: Chromatogramy vzorků získaných extrakcí z hub. Kyselina ibotenová a muscimol byly získány z *Amanita pantheria* (20x zředěno). Alfa-amanitin, beta-amanitin a faloidin získány z *Amanita virosa* (100x zředěno).⁵¹

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Metanol (HiPerSolv Chromanorm)
Acetonitril (Fluko Analytical)
Deionizovaná voda (Milli-Q-Reference)
Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich)
Hydrogenuhlíčitan sodný (Lachema Brno)
Octan sodný (Sigma Aldrich)
Kyselina octová (Sigma Aldrich)
Hydroxid sodný (Sigma Aldrich)
Standard: Alfa-amanitin (Sigma Aldrich)
Standard: Beta-amanitin (Sigma Aldrich)

3.2 Biologický materiál

Muchomůrka zelená
Vzorky moče

3.3 Instrumentace a metody

Vysokoúčinný kapalinový chromatogram Waters Acquity
Hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem a trojitým kvadrupólovým analyzátořem Waters Xevo TQD
Chromatografická kolona Acclaim[™] RSLC 120 C18; 2,2 μ m 120 Å; 2,1 x 100 mm; Dionex bonded silica products

Parametry ionizace elektrosprejem byly optimalizovány pro získání nejvyššího signálu na směsném standardu alfa-amanitinu a beta-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml. Jako rozpouštědlo byl použit 50% vodný roztok metanolu. Optimalizace byla měřena v záporném režimu ionizace. Byly optimalizovány tyto parametry: teplota desolvatace, průtok desolvatačního plynu, teplota na zdroji, napětí na vstupním kuželu, napětí na sprejovací kapiláře a kolizní energie. Optimalizace parametrů je znázorněna v tabulce 3.

Tab. 3: Optimalizace parametrů ESI ionizace.

Parametr	Rozmezí optimalizace	Interval	Vybraná hodnota
Teplota desolvatace	200 - 650 °C	100 °C	600 °C
Napětí na sprejovací kapiláře	1 - 3 kV	1 kV	2 kV
Průtok desolvatačního plynu	200 - 1000 l/hr	200 l/hr	400 l/hr
Teplota na zdroji	100, 150 °C	-	150 °C
Napětí na vstupním kuželu	10 - 60 V	10 V	30 V
Kolizní energie	10 - 35 V	5 V	35 V

Separace alfa-amanitinu a beta-amanitinu byla provedena gradientovou elucí na koloně Acclaim RSLC 120 C18. Mobilní fáze byla složena z 0,5% vodného roztoku kyseliny mravenčí (A) a 100% acetonitrilu (B). Profil gradientu pro alfa-amanitin je uveden v tabulce 4 a pro beta-amanitin v tabulce 5. Zpomalení průtoku z 0,6 ml/min na 0,2 ml/min v časech 2,27 - 2,61 minut pro alfa-amanitin a 2,32 – 2,81 minut pro beta-amanitin mělo za cíl zvýšit odezvu na tyto analyty zvýšením počtu skenů během jejich eluce. Při společném měření amanitinů jednou metodou nedošlo k jejich úplné separaci. V metodě na beta-amanitin interferuje izotopický pík alfa-amanitinu o m/z 918 a uměle tak zvyšuje plochu beta-amanitinu. Tato interference je řešena matematickou korekcí, která je popsána níže při kvantifikaci amanitinů v reálných vzorcích.

Tab. 4: Profil gradientu pro alfa-amanitin.

čas [min]	průtok [ml/min]	A [%]	B [%]
0	0,6	98	2
1	0,6	98	2
2,25	0,6	69,7	30,3
2,27	0,2	68	32
2,60	0,2	68	32
2,61	0,6	68	32
5,20	0,6	10	90
5,50	0,6	98	10

Tab. 5: Profil gradientu pro beta-amanitin.

čas [min]	průtok [ml/min]	A [%]	B [%]
0	0,6	98	2
1	0,6	98	2
2	0,6	69,7	30,3
2,32	0,2	68	32
2,80	0,2	68	32
2,81	0,6	68	32
5,20	0,6	10	90
5,50	0,6	98	10

Kvantifikace alfa-amanitinu a beta-amanitinu byla provedena metodou kalibrační křivky za použití vodného roztoku kyseliny dinitrobenzoové o koncentraci 0,2 µg/ml jako interního standardu. Amatoxiny byly analyzovány metodou MRM (multiple reaction monitoring), kdy byly sledovány dva nejintenzivnější produktové ionty v kolizním spektru. Kolizní energie činila 35 V. Byly vybrány ionty o hodnotách m/z 463,1 a 899,2 pro alfa-amanitin a o hodnotách m/z 463,1 a 900,2 pro beta-amanitin.

Interní standard byl analyzován metodou MS scan, kdy byly sledovány ionty v rozsahu hodnot m/z 50 až 1000. Měření probíhalo v záporném módu ionizace. Doba každého skenu byla nastavena na 0,5 s.

Pro měření kalibrační závislosti byly připraveny roztoky standardů alfa-amanitinu a beta-amanitinu o koncentracích 10 µg/ml a 100 ng/ml. Jako rozpouštědlo byl použit 50% vodný roztok metanolu. Z těchto zásobních roztoků byly připraveny

jednotlivé nižší koncentrace vodných roztoků standardů pro měření kalibrační závislosti. Koncentrace jednotlivých bodů kalibrační křivky byly 5, 10, 30, 100, 300 a 1000 ng/ml.

Opakovatelnost metody byla hodnocena z pěti bezprostředně po sobě následujících měření vodných roztoků standardů alfa-amanitinu a beta-amanitinu o koncentracích 30 ng/ml a 100 ng/ml.

Mez detekce a mez stanovitelnosti byla vypočítána ze směrnice kalibračních křivek podle vzorce a také byla vyjádřena vizuálně.

Pro měření alfa-amanitinu a beta-amanitinu z reálného vzorku byl připraven extrakt z muchomůrky zelené a byla připravena houbová polévka z muchomůrky zelené. Bylo naváženo 1,3 g plodnice. K tomuto substrátu bylo přidáno 6 ml deionizované vody a směs byla homogenizována ve třecí misce s tloučkem po dobu tří minut. Následně byl homogenizát sonifikován v ultrazvukové lázni při teplotě 60°C po dobu 10 minut. Homogenizát byl následně zfiltrován a filtrát byl použit k SPE extrakci.

K SPE extrakci byly použity kolonky WCX od firmy Waters. Kondicionace kolonky byla provedena aplikací 1 ml metanolu. Ekvilibrace byla provedena aplikací 1 ml 0,1 M hydrogenuhličitanového pufru o *pH* 10 s obsahem vodného roztoku dipeptidu (AlaPhe) o koncentraci 1 µg/ml. Přídavek dipeptidu byl zvolen za účelem zvýšení návratnosti amatoxinů na WCX sorbentu. Poté byl aplikován 1 ml filtrátu (extrakt z plodnice muchomůrky zelené). Kolonka byla promyta 1 ml deionizované vody a eluce byla provedena 1 ml 40% vodného roztoku metanolu.

Pro přípravu houbové polévky bylo považeno přibližně 150 gramů brambor, 50 gramů žampionů, jedno vejce a 20 gramů muchomůrky zelené. Celkový objem polévky byl jeden litr. SPE extrakce byla provedena stejným způsobem, jako v případě extraktu z muchomůrky zelené.

Analyzovány byly také vzorky moče, které byly spikovány vodným roztokem alfa-amanitinu na koncentraci 5 ng/ml. Vzorky moče s definovaným obsahem alfa-amanitinu byly extrahovány výše popsaným způsobem.

Byla provedena derivatizace amanitinů dansylchloridem s cílem zjistit, zda derivatizace nepovede ke zvýšení odezvy a tedy snížení detekčních limitů. Byl připraven 0,1 M pufr NaHCO₃ o *pH* 10. Bylo naváženo 5 mg dansylchloridu, který byl

rozpuštěn v acetonitrilu o objemu 5 ml. Výsledná koncentrace dansylchloridu byla 1 mg/ml. Pro derivatizaci bylo smícháno 250 μ l roztoku dansylchloridu a 250 μ l připraveného pufru. K tomuto roztoku bylo přidáno 5 μ l roztoku alfa-amanitinu o koncentraci 10 μ g/ml. Výsledná koncentrace alfa-amanitinu tak byla 100 ng/ml. Derivatizace probíhala při teplotě 65° C po dobu 5 minut. Analýzou derivátu alfa-amanitinu v kladném režimu bylo zjištěno, že vzniká pouze jednou dansylovaný derivát o m/z 1152,41. Byla vytvořena MRM metoda pro dansylovaný alfa-amanitin, kde byl sledován produktový iont disociace o m/z 259,1.

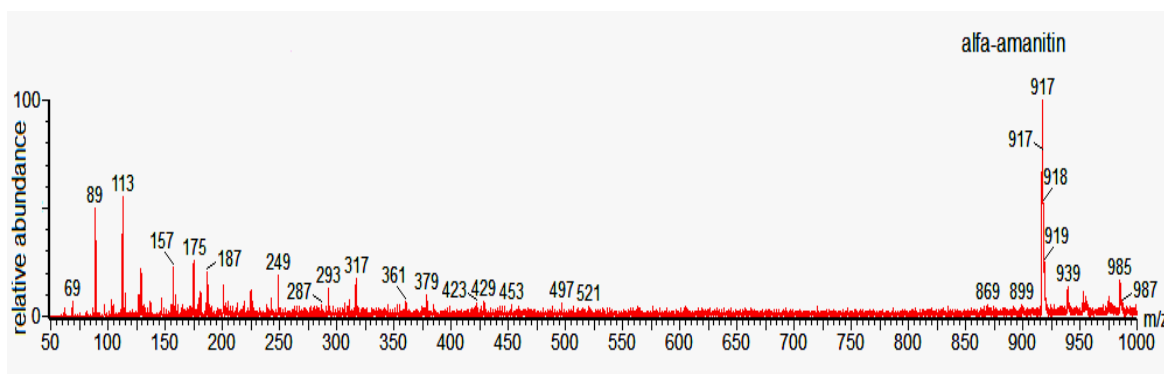
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro stanovení amanitinů byla vyvinuta LC-MS metoda využívající trojitý kvadrupól jako analyzátor. Na obr. 28 je znázorněno MS spektrum alfa-amanitinu o m/z 917 z přímého nástřiku.

Metodou MS/MS byly zjištěny produktové ionty disociace alfa-amanitinu a beta-amanitinu, které byly použity pro jejich stanovení v MRM módu. MS/MS spektrum alfa-amanitinu je znázorněno na obr. 29 a beta-amanitinu na obr. 30. Pro oba amanitiny byly použity produktové ionty o m/z 463 a dále ionty představující ztrátu vody (m/z 899 pro alfa-amanitin a m/z 900 pro beta-amanitin).

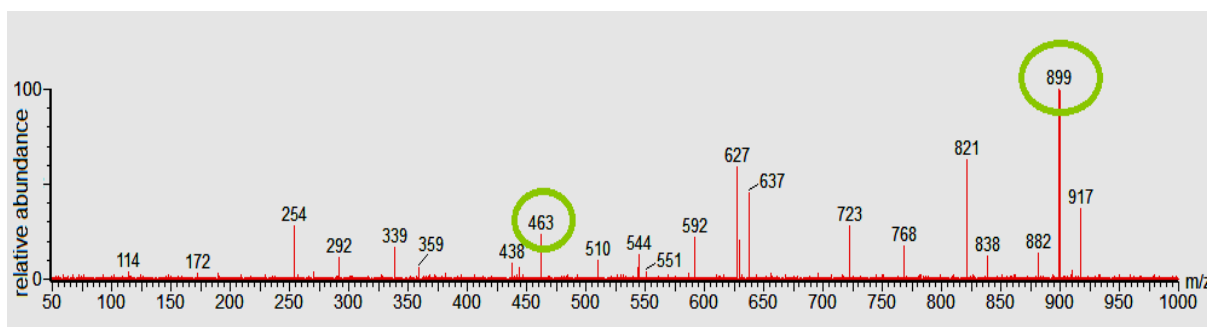
4.1 Chromatografická separace a hmotnostně spektrometrická data standardů

4.1.1 MS spektrum standardu alfa-amanitinu

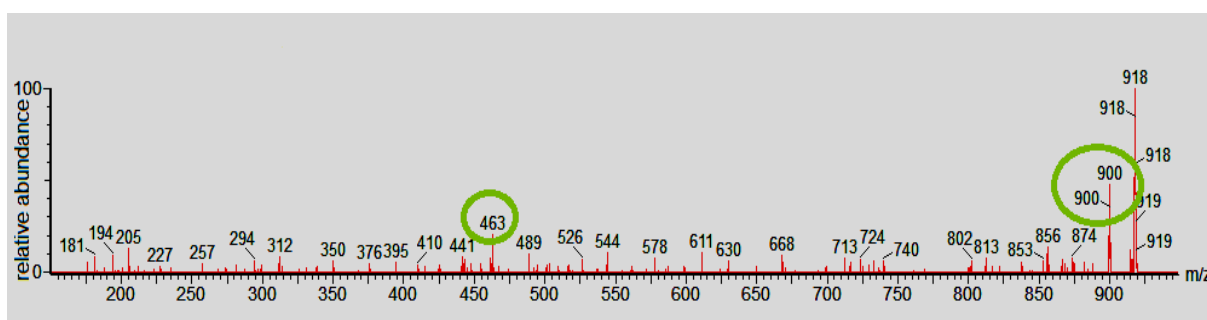


Obr. 28: MS spektrum standardu alfa-amanitinu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ ve vodě.

4.1.2 MS/MS spektra alfa-amanitinu a beta-amanitinu



Obr. 29: MS/MS spektrum standardu alfa-amanitinu o koncentraci 10 µg/ml ve vodě. Zvýrazněny jsou dva produktové ionty m/z 899 a m/z 463, které byly použity pro MRM záznam.

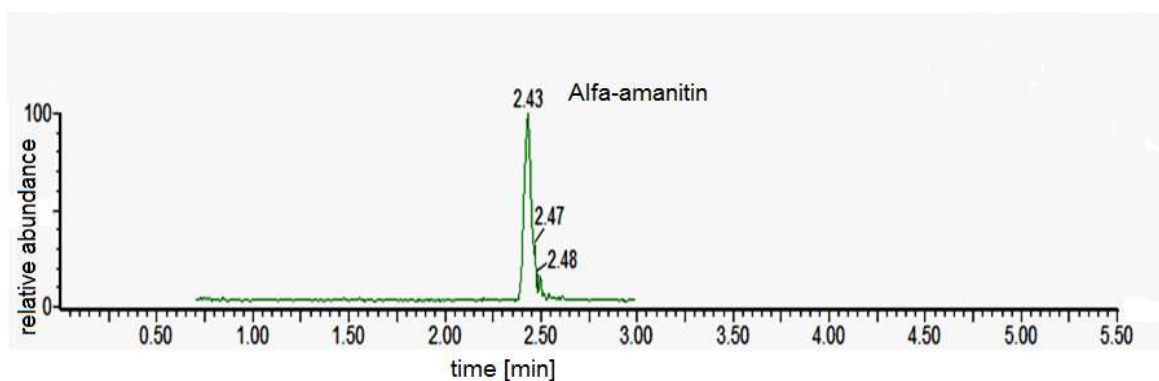


Obr. 30: MS/MS spektrum standardu beta-amanitinu o koncentraci 10 µg/ml ve vodě. Zvýrazněny jsou dva produktové ionty m/z 900 a m/z 463, které byly použity pro MRM záznam.

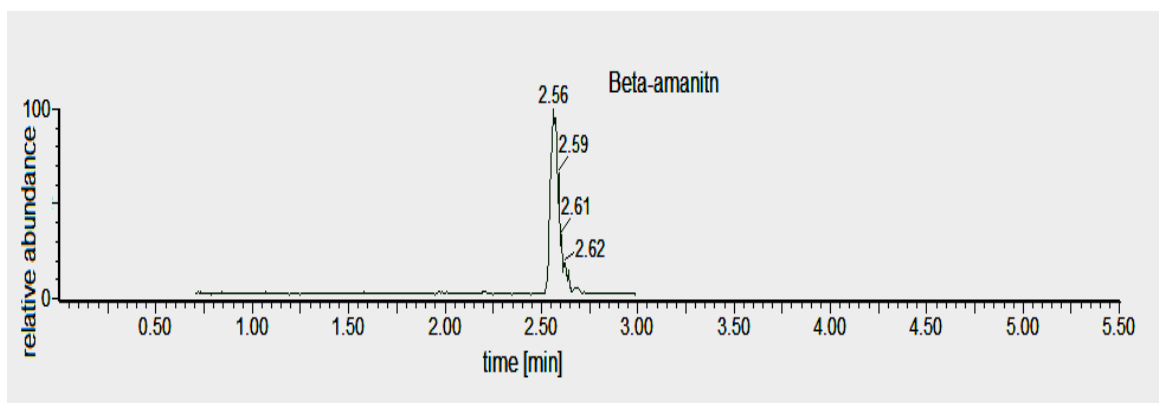
4.1.3 MRM chromatogramy alfa-amanitinu a beta-amanitinu

MRM chromatogramy alfa-amanitinu a beta-amanitinu jsou znázorněny na obr. 31 a obr. 32. Při chromatografické separaci byla použita gradientová eluce se změnou rychlosti průtoku. V čase eluce amanitinů byla snížena rychlost průtoku z 0,6 ml/min na 0,2 ml/min, což vedlo ke zvýšení počtu skenů během eluce amanitinů a tím k nárůstu odezvy a snížení LOD. Srovnání chromatogramů a odezev amanitinů před snížením rychlosti průtoku a po něm je znázorněno na obr. 34 a obr. 35. Odezva

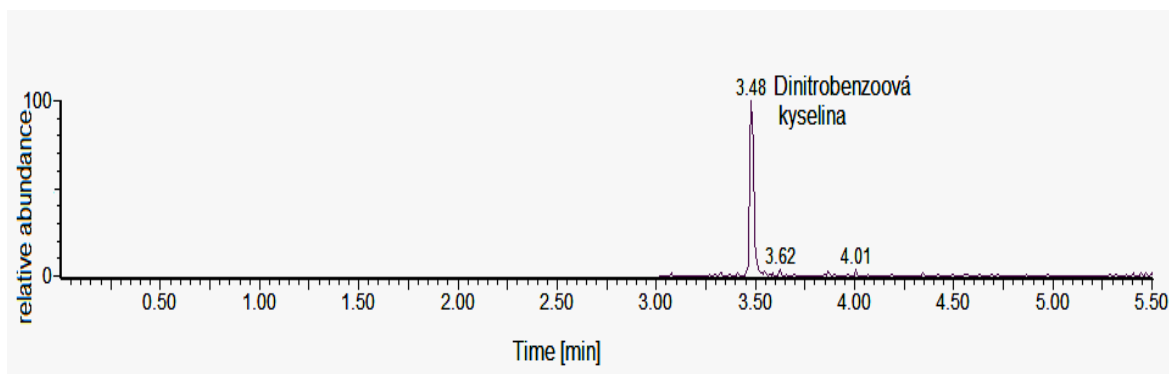
amanitinu snížením rychlosti průtoku vzrostla více než třikrát. Měření probíhalo za přídavku interního standardu vodného roztoku kyseliny dinitrobenzoové o koncentraci 0,2 µg/ml. Ionový chromatogram interního standardu je znázorněn na obr. 33.



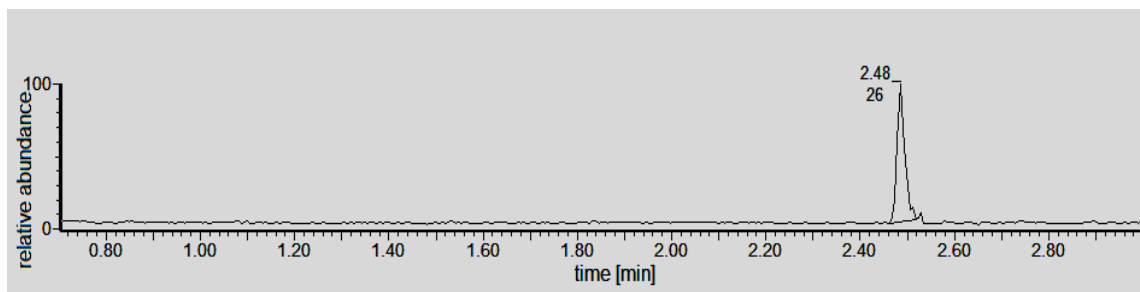
Obr. 31: MRM chromatogram alfa-amanitinu (m/z 917) o koncentraci 100 ng/ml ve vodě.



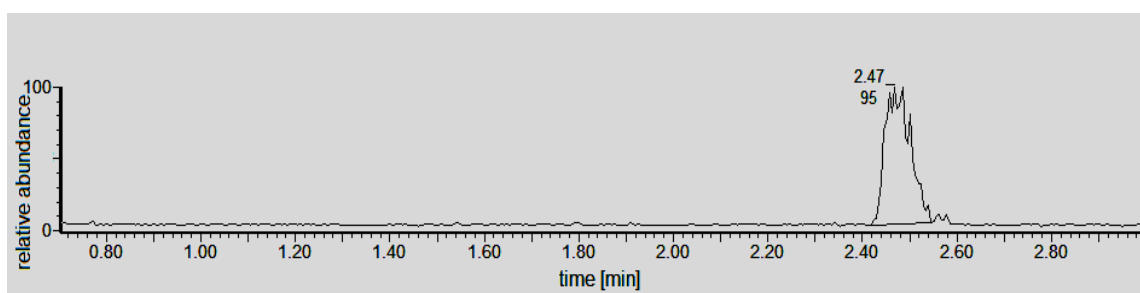
Obr. 32: MRM chromatogram beta-amanitinu (m/z 918) o koncentraci 100 ng/ml ve vodě.



Obr. 33: Ionový chromatogram interního standardu kyseliny dinitrobenzoové (m/z 211,1) o koncentraci 0,2 µg/ml ve vodě.



Obr. 34: MRM chromatogram alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml při konstantním průtoku 0,6 ml/min.



Obr. 35: MRM chromatogram alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml při snížení průtoku na 0,2 ml/min v době eluce alfa-amanitinu.

4.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byla stanovena dvěma způsoby. Prvním způsobem je výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti pomocí matematických vzorců:

$$\text{LOD} = (3,3 \times \sigma) / s$$

$$\text{LOQ} = (10 \times \sigma) / s$$

σ = směrodatná odchylka úseku kalibrační přímky

s = směrnice kalibrační přímky

Druhý způsob určení je vizuálně z chromatogramů kalibrantů. LOD byl určen jako koncentrace kalibrantu, který poskytl poměr signálu kalibrantu a šumu vyšší než tři. LOQ byl určen jako koncentrace kalibrantu, který poskytl poměr signálu kalibrantu a šumu vyšší než deset.

1a) LOD výpočtem

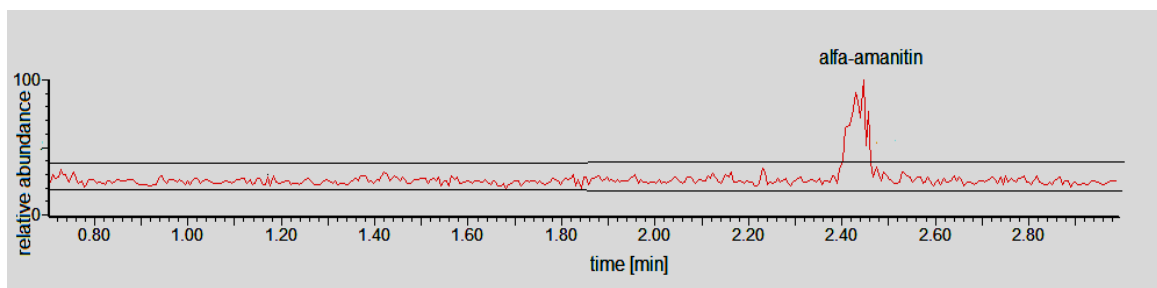
$$\text{LOD}_{\text{alfa-amanitin}} = 33 \text{ ng/ml}$$

$$\text{LOD}_{\text{beta-amanitin}} = 27 \text{ ng/ml}$$

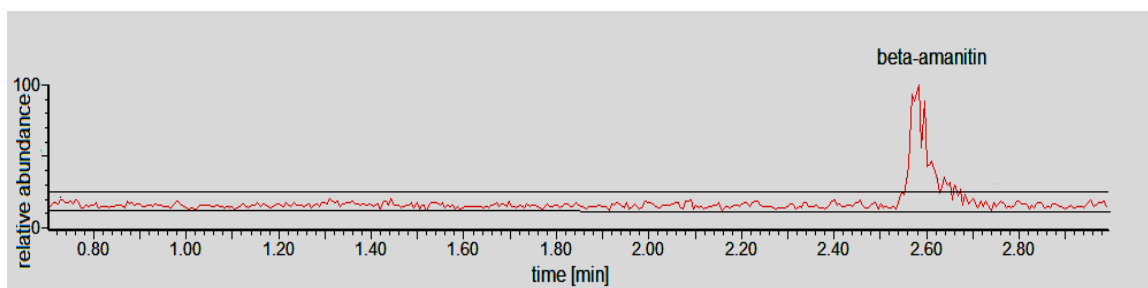
1b) LOD vizuálně

$$\text{LOD}_{\text{alfa-amanitin}} = 5 \text{ ng/ml}$$

$$\text{LOD}_{\text{beta-amanitin}} = 10 \text{ ng/ml}$$



Obr. 36: Mez detekce – MRM spektrum alfa-amanitinu (m/z 917) o koncentraci 5 ng/ml.



Obr. 37: Mez detekce – MRM spektrum beta-amanitinu (m/z 918) o koncentraci 10 ng/ml.

2a) LOQ výpočtem

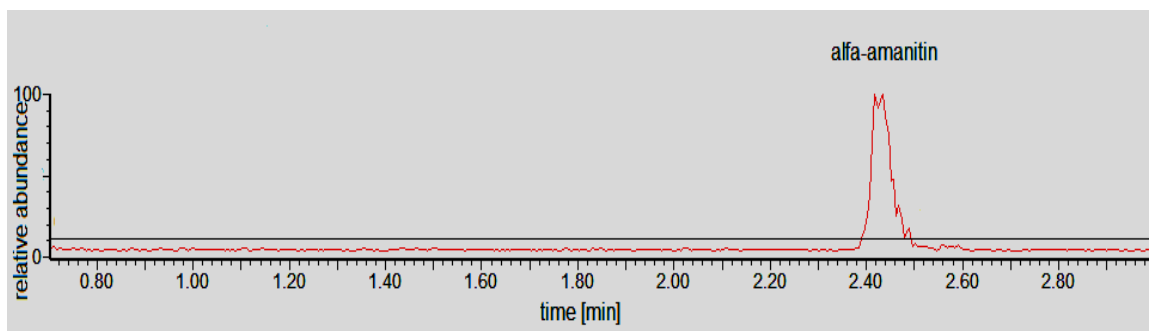
$LOQ_{\text{alfa-amanitin}} = 101 \text{ ng/ml}$

$LOQ_{\text{beta-amanitin}} = 83 \text{ ng/ml}$

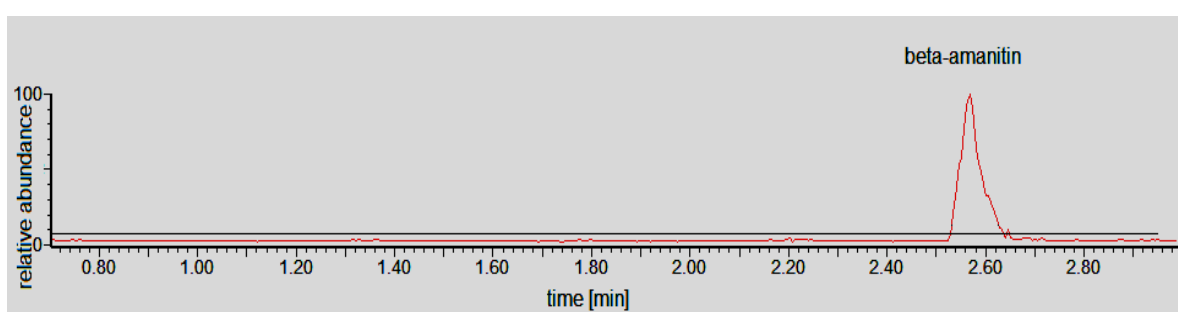
2b) LOQ vizuálně

$LOQ_{\text{alfa-amanitin}} = 30 \text{ ng/ml}$

$LOQ_{\text{beta-amanitin}} = 100 \text{ ng/ml}$



Obr. 38: Mez stanovitelnosti – MRM spektrum alfa-amanitinu (m/z 917) o koncentraci 30 ng/ml.

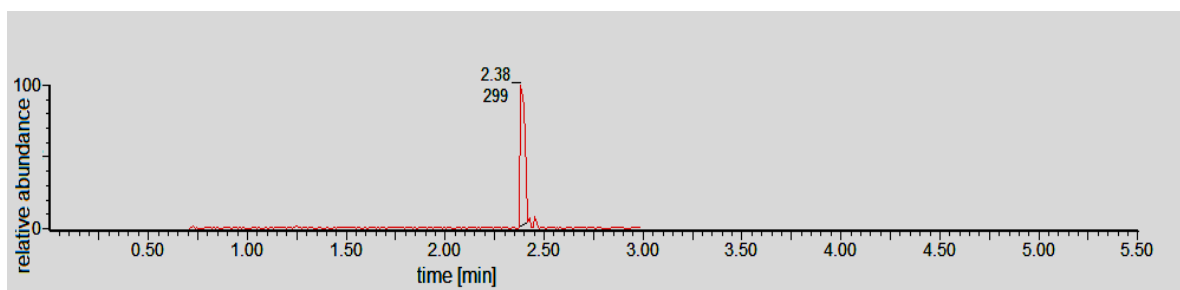


Obr. 39: Mez stanovitelnosti – MRM spektrum beta-amanitinu (m/z 918) o koncentraci 100 ng/ml.

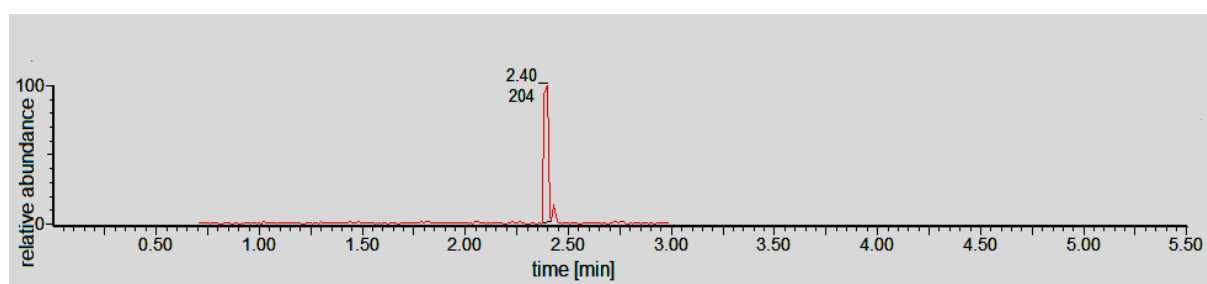
4.3 Matricový efekt

Pro zjištění vlivu matrice na výsledky měření byly změřeny standardy alfa-amanitinu ve vodě a vzorky extrahované moče spikované alfa-amanitinem na celkovou koncentraci 100 ng/ml. Pro minimalizaci vlivu kolísání intenzity zdroje byl přidán interní standard, což byl vodný roztok kyseliny dinitrobenzoové o celkové koncentraci 0,2 µg/ml. Porovnáním ploch píků alfa-amanitinu (vztažených na plochu píku standardu) měřených ve vodě a v matrici bylo zjištěno, že matricový efekt je zanedbatelný. Byl použit Studentův t-test shody aritmetických průměrů na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Aritmetické průměry normalizovaných ploch píků byly 0,003600822 pro standard bez matrice a 0,002933766 pro vzorek s matricí. Směrodatné odchylky byly 0,00141 pro standard bez matrice a 0,001019 pro vzorek s matricí. Oba aritmetické průměry byly shodné. Z tohoto důvodu byly kalibrační

křivky a opakovatelnost měřeny na vodných roztocích standardů alfa-amanitinu a beta-amanitinu.



Obr. 40: Matricový efekt – MRM chromatogram alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml ve vodě.



Obr. 41: Matricový efekt – MRM chromatogram extraktu moče spikované alfa-amanitinem na koncentraci 100 ng/ml.

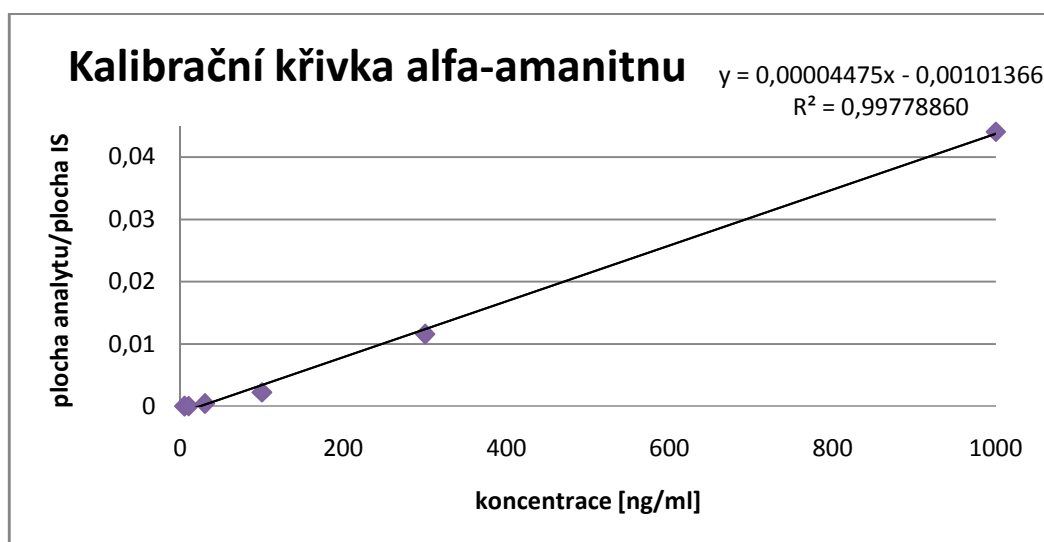
4.4 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla vyhodnocena z pěti po sobě následujících měření standardů alfa-amanitinu a beta-amanitinu o koncentracích 30 ng/ml a 100 ng/ml. Hodnoty byly testovány Dean-Dixonovým testem odlehlých hodnot na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Žádná z naměřených hodnot alfa-amanitinu o koncentracích 30 ng/ml a 100 ng/ml nebyla odlehlá. V případě naměřených hodnot beta-amanitinu o koncentraci 30 ng/ml byla odlehlá jedna hodnota. Byla tak před analýzou vyloučena, aby bylo zabráněno zkreslení statistického zpracování dat. Žádná z naměřených hodnot beta-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml nebyla odlehlá.

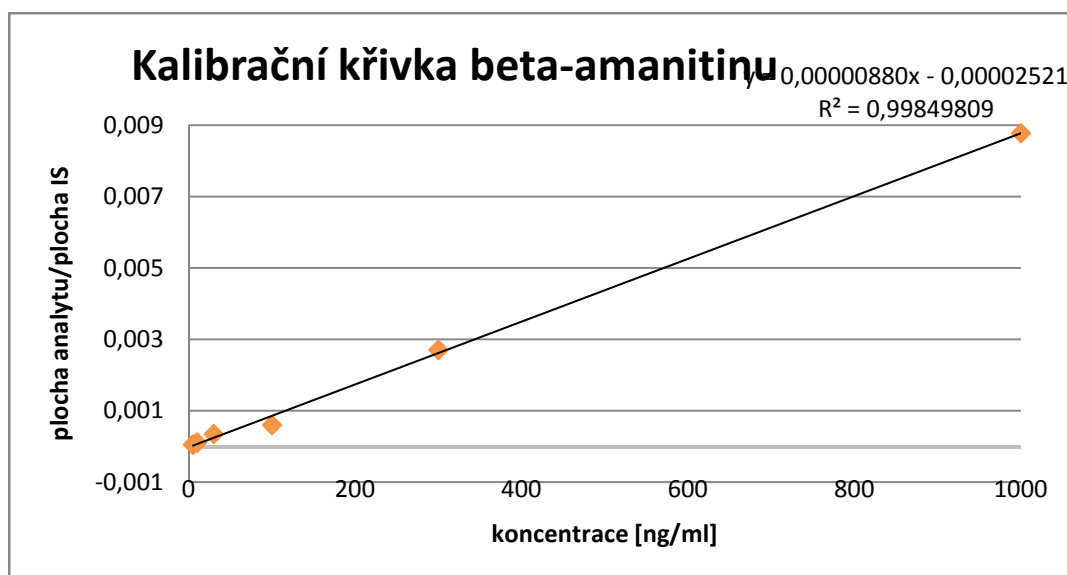
Tab. 6: Opakovatelnost.

Látka	Koncentrace [ng/ml]	RSD [%]	Koncentrace [ng/ml]	RSD [%]
Alfa-amanitin	30	10,9	100	9,6
Beta-amanitin	30	7,6	100	12,2

4.5 Kalibrační křivky



Obr. 42: Závislost normalizované plochy píku na koncentraci alfa-amanitinu.

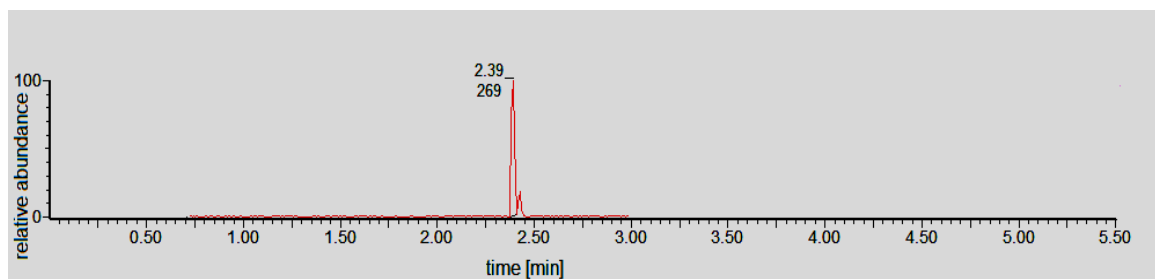


Obr. 43: Závislost normalizované plochy píku na koncentraci beta-amanitinu.

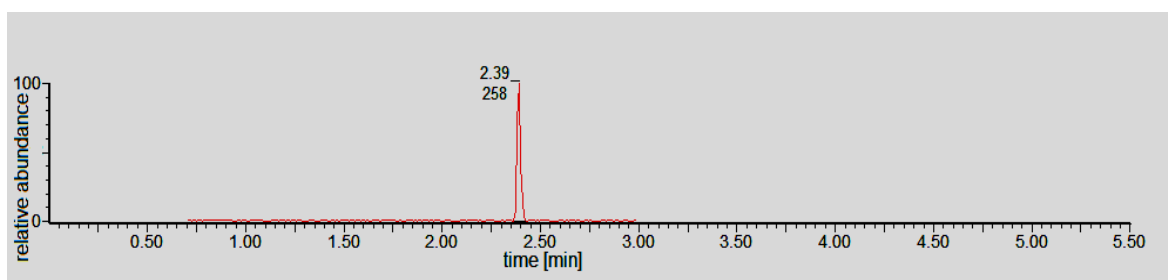
4.6 Zvýšení návratnosti amatoxinů pomocí dipeptidu

Z normalizované plochy píku alfa-amanitinu bez extrakce a po extrakci byla vypočítána návratnost extrakce 63 %. Každé měření bylo provedeno ve třech opakováních. Aritmetický průměr normalizovaných ploch píků byl 0,003600963 pro vzorek bez extrakce (RSD = 0,33 %) a 0,002260578 pro extrahovaný vzorek (RSD = 2,87 %).

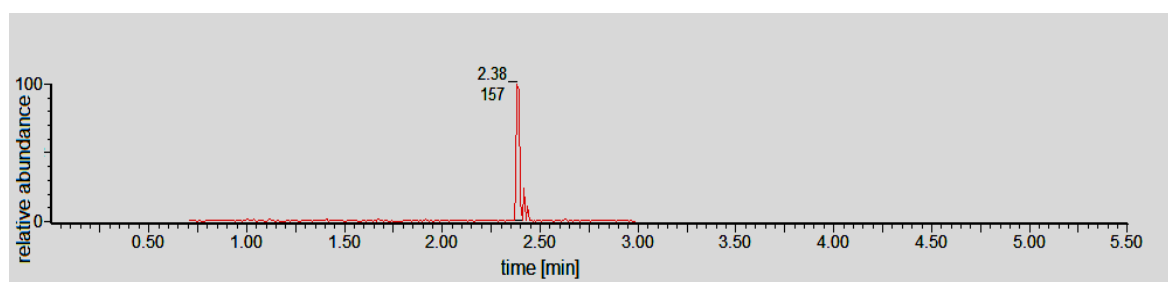
Ve snaze o zvýšení návratnosti byla před extrakcí na SPE kolonku nanесena látka podobající se svou chemickou povahou analytům (dipeptid AlaPhe). Předpokladem bylo, že tento dipeptid obsadí případná aktivní místa SPE sorbentu, která by mohla nevratně vázat analyty a tím snižovat jejich návratnost. Z normalizované plochy píku alfa-amanitinu bez extrakce a po extrakci za použití dipeptidu byla vypočítána návratnost extrakce 94 %. Měření bylo provedeno ve třech opakováních. Aritmetický průměr normalizovaných ploch píků pro extrahovaný vzorek za použití dipeptidu byl 0,003239752 (RSD = 4,94 %).



Obr. 44: MRM chromatogram neextrahovaného alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml.



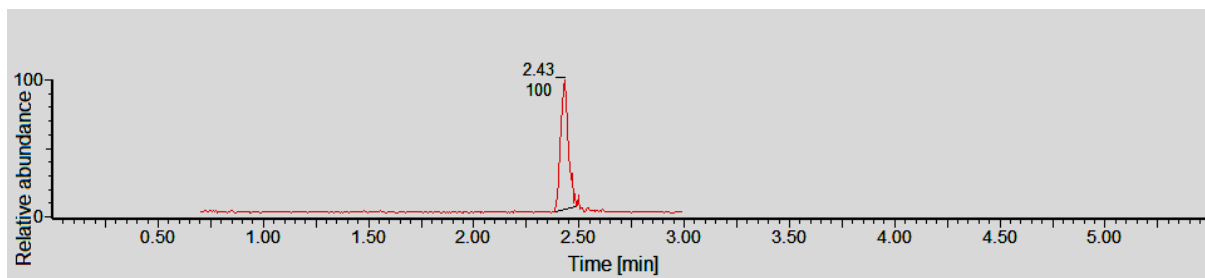
Obr. 45: MRM chromatogram extrahovaného alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml za použití dipeptidu o koncentraci 1 µg/ml. Návratnost je 94 %.



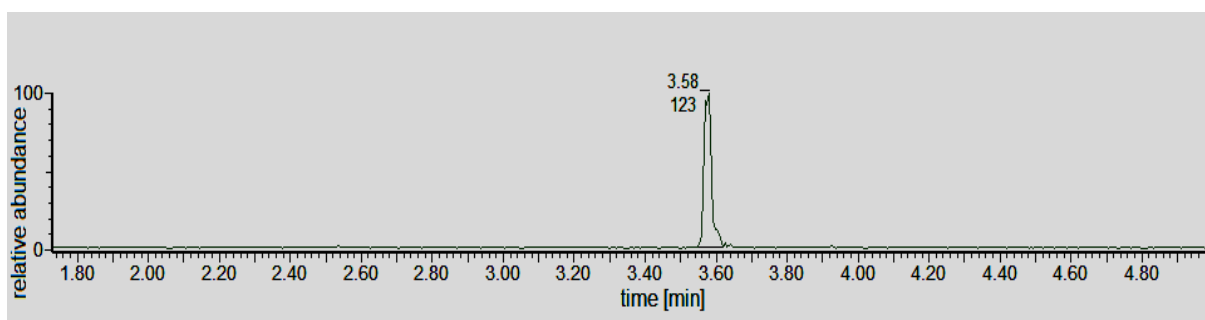
Obr. 46: MRM chromatogram extrahovaného alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml bez použití dipeptidu. Návratnost je 63 %.

4.7 Derivatizace dansyl-chloridem

Porovnáním odezev nedansylovaného a dansylovaného alfa-amanitinu bylo zjištěno, že derivatizace významně nenavýšuje odezvu alfa-amanitinu. Proto bylo od derivatizace upuštěno.



Obr. 47: MRM chromatogram alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml.



Obr. 48: MRM chromatogram dansylovaného alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml.

4.8 Stanovení amatoxinů v reálných vzorcích

Při počítání obsahu amatoxinů v reálných vzorcích byly použity dvě korekce. První korekce byla použita z toho důvodu, že ionty fragmentů alfa-amanitu o m/z 899 a beta-amanitinu o m/z 900, odpovídající neutrální ztrátě H_2O , nejsou příliš specifické. Ztrátu vody vykazuje velké množství sloučenin, které by mohly být přítomny v reálném vzorku vedle amatoxinů. Z MRM chromatogramu standardu byl vypočítán poměr plochy píku iontu o m/z 899 pro alfa-amanitin (o m/z 900 pro beta-amanitin) a plochy píku iontu o m/z 463. V reálných vzorcích byl pozorován tento

poměr vyšší, jelikož je větší plocha píku iontů o m/z 899 a 900. Tento poměr ploch píků byl v reálných vzorcích průměrně pětkrát vyšší, než u standardů. Pomocí poměru zjištěného z MRM chromatogramu standardu byla korigována plocha píku iontu 899 (případně 900) v reálných vzorcích. Sečtením korigované plochy iontu 899 (900) a plochy iontu 463 byla poté vypočítána korigovaná plocha píku alfa-amanitinu a beta-amanitinu. Tato korigovaná plocha byla poté použita při kvantifikaci.

Druhá korekce byla použita pouze při kvantifikaci beta-amanitinu. MRM metoda pro stanovení beta-amanitinu zachycuje kromě iontu o m/z 918 představujícího beta-amanitin, také izotopický iont alfa-amanitinu, který má hodnotu m/z také 918. Dochází tak k umělému navýšení plochy píku beta-amanitinu. Bylo vypočteno, že intenzita izotopického píku alfa-amanitinu 918 dosahuje 48 % intenzity píku 917. Proto bylo z plochy píku iontu 463 odečteno vždy 48 % plochy. Z takto zkorigované plochy píku 463 a z poměru ploch píků iontů 463 a 900 zjištěného z MRM chromatogramu standardu, byla vypočítána korigovaná plocha iontu 900. Sečtením korigovaných ploch píků 463 a 900 byla zjištěna korigovaná plocha píku beta-amanitinu.

4.8.1 Stanovení amatoxinů v plodnici muchomůrky zelené

Stanovení alfa-amanitinu:

Průměrná normalizovaná plocha píku alfa-amanitinu ve 100 x zředěném extraktu muchomůrky zelené:

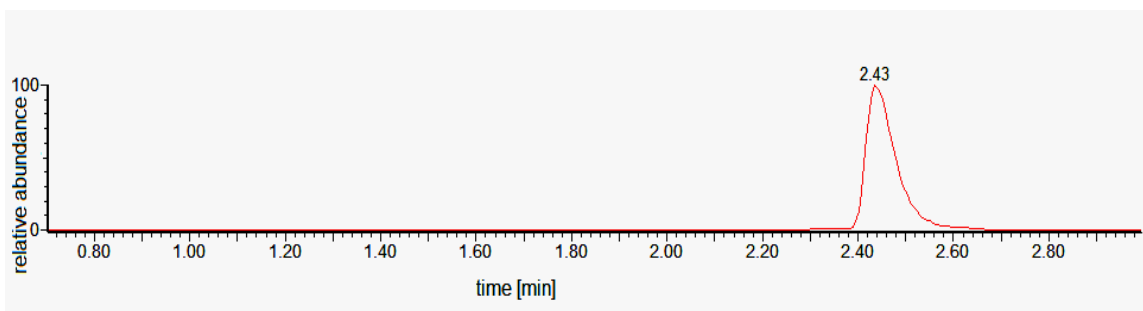
0,001466834 (RSD = 6,6 %)

Rovnice regrese alfa-amanitinu:

$$y = 0,00004475x - 0,00101366$$

$$x = 32,77 \text{ ng/ml } (\pm 2,26 \text{ ng/ml})$$

Koncentrace v 6 ml extraktu byla 3277 ng/ml. Bylo naváženo 1,3 g plodnice muchomůrky zelené. Plodnice muchomůrky zelené obsahovala 0,0015 % (m/m) alfa-amanitinu.



Obr. 49: MRM chromatogram alfa-amanitinu extrahovaného z muchomůrky zelené.

Stanovení beta-amanitinu:

Průměrná normalizovaná plocha píku beta-amanitinu ve 100 x zředěném extraktu muchomůrky zelené:

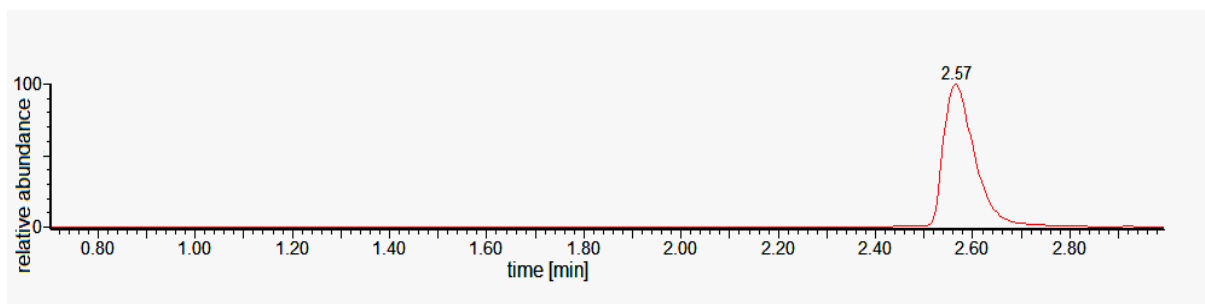
0,000391529 (RSD = 5,3 %)

Rovnice regrese beta-amanitinu:

$$y = 0,00000880x - 0,00002521$$

$$x = 44,49 \text{ ng/ml } (\pm 2,36 \text{ ng/ml})$$

Koncentrace v 6 ml extraktu byla 4449 ng/ml. Bylo naváženo 1,3 g plodnice muchomůrky zelené. Plodnice muchomůrky zelené obsahovala 0,0021 % (m/m) beta-amanitinu.



Obr. 50: MRM chromatogram beta-amanitinu extrahovaného z muchomůrky zelené.

4.8.2 Stanovení amatoxinů v polévce

Stanovení alfa-amanitinu:

Průměrná normalizovaná plocha píku alfa-amanitinu v 10 x zředěném extraktu polévky:

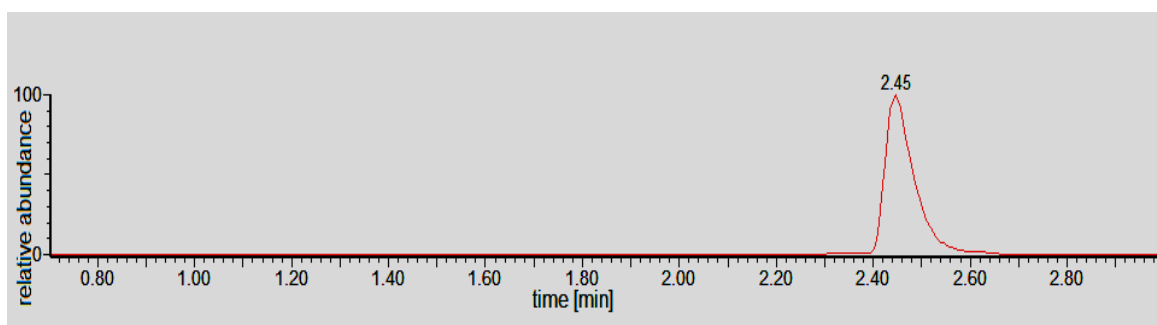
0,01228728 (RSD = 9,1 %)

Rovnice regrese alfa-amanitinu:

$$y = 0,00004475x - 0,00101366$$

$$x = 276,3 \text{ ng/ml } (\pm 25,1 \text{ ng/ml})$$

Polévka z muchomůrky zelené obsahovala alfa-amanitin o koncentraci 2763 ng/ml. Celkové množství alfa-amanitinu v polévce o objemu 1 litru tak bylo 2,76 mg.



Obr. 51: MRM chromatogram alfa-amanitinu extrahovaného z polévky z muchomůrky zelené.

Stanovení beta-amanitinu:

Průměrná normalizovaná plocha píku beta-amanitinu v 10 x zředěném extraktu polévky:

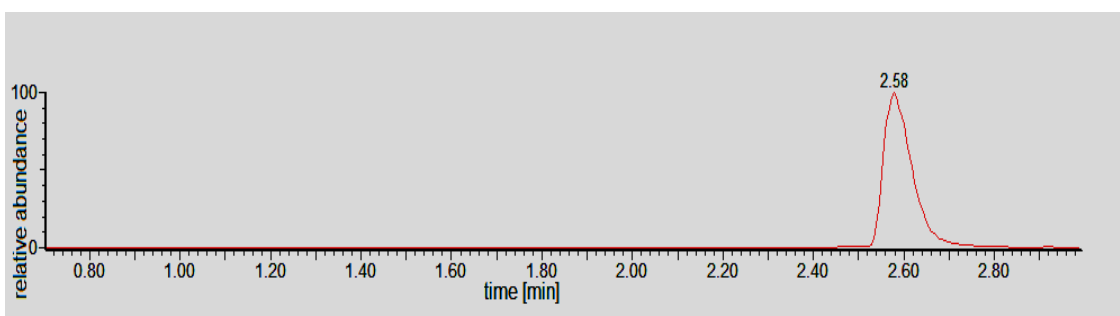
0,001679839 (RSD = 9,7 %)

Rovnice regrese beta-amanitinu:

$$y = 0,00000880x - 0,00002521$$

$$x = 190,9 \text{ ng/ml } (\pm 18,5 \text{ ng/ml})$$

Polévka z muchomůrky zelené obsahovala beta-amanitin o koncentraci 1909 ng/ml. Celkové množství beta-amanitinu v polévce o objemu 1 litr tak bylo 1,91 mg.

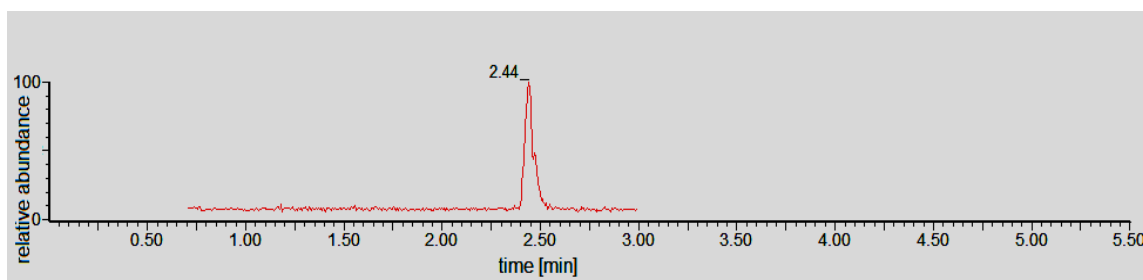


Obr. 52: MRM chromatogram beta-amanitinu extrahovaného z polévky z muchomůrky zelené.

Výsledky obsahu amanitinů v muchomůrce zelené jsou přibližně stokrát menší, než výsledky prezentované v literatuře. V této práci byly amanitiny stanovovány ve zmražené muchomůrce, zatímco v literatuře byly amanitiny stanovovány v sušené muchomůrce. Sušením by se mohly výsledky posunout až o řád k vyšším koncentracím. V extraktu polévky je již zjištěný obsah amanitinů vyšší a odpovídá očekávaným hodnotám. Jedním z možných důvodů, proč je obsah amanitinů v extraktech muchomůrky menší, než v extraktech polévky jsou rozdílné podmínky extrakce. V případě muchomůrky probíhala extrakce při teplotě 60° C, zatímco v případě polévky byla muchomůrka uvařena. Před začátkem extrakce byla v homogenizátu muchomůrky mnohem vyšší koncentrace amanitinů, než v polévce, což mohlo vést k daleko rozsáhlejší adsorpci amanitinů na hmotu muchomůrky, která zůstala zachycena na filtru. Extrakce z houby tedy nemusela proběhnout kvantitativně. Houba také mohla obsahovat méně toxinů, protože jejich obsah je v různých houbách stejného druhu velmi variabilní.

4.8.3 Stanovení amatoxinů v moči

Vzorky moče byly spikovány standardem alfa-amanitinu na výslednou koncentraci 5 ng/ml. Tyto vzorky byly extrahovány pomocí SPE a následně analyzovány.



Obr. 53: MRM chromatogram extrahovaného vzorku moče s koncentrací alfa-amanitinu 5 ng/ml.

4.7 Srovnání metody s metodami popsanými v literatuře

V literatuře byla popsána metoda HPLC-MS pro stanovení alfa-amanitinu a beta-amanitinu v moči a v plazmě, která použila ionizaci elektrosprejem a separaci na koloně s reverzní fází HP ODS Hypersil RP-18 s velikostí částic 3 μm . Byla použita gradientová eluce. Mobilní fázi tvořily metanol a 0,01 M octan amonný *pH* 5 v poměru 10:90 (A) a v poměru 30:70 (B). Pro extrakci amatoxinů byly použity imunoafinitní kolonky (IAE). Celková doba analýzy byla 11,5 minut, což je více než dvojnásobná délka analýzy ve srovnání se zde popsanou metodou, kde je celkový čas analýzy 5,5 minut. Metoda vykazuje nižší mez detekce a mez stanovitelnosti. Pro alfa-amanitin i beta-amanitin uvádí LOD 2,5 ng/ml a LOQ 5 ng/ml. Mez detekce zde popsanou metodou je 5 ng/ml pro alfa-amanitin a 10 ng/ml pro beta-amanitin a mez kvantifikace je 30 ng/ml pro alfa-amanitin a 100 ng/ml pro beta-amanitin. Návratnost alfa-amanitinu po extrakci je 61 %, což je menší návratnost, než v případě naší metody. Návratnost alfa-amanitinu na WCX sorbentech za použití dipeptidu o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ při ekvilibraci kolonky dosahuje 92 %. ³⁷

Další popsaná metoda stanovení amatoxinů pomocí kapalinové chromatografie je metoda UPLC-MS/MS. Byla použita kolona Acquity UPLC HSS T3 o velikosti částic 1,3 μm . Byla použita ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Jako analyzátor byl použit trojitý kvadrupól stejně, jako v naší metodě. Pro MRM záznam byly také pozorovány fragmenty po odštěpení vody (m/z 901 pro alfa-amanitin a m/z 902 pro beta-amanitin) a dále fragment také společný pro oba toxiny (m/z 259). Byla použita gradientová eluce, kdy mobilní fáze A byla složena z 0,02 M octanu amonného pH 5 a mobilní fáze B byla složena z acetonitrilu. I v této metodě byl celkový čas analýzy 10 minut téměř dvojnásobný ve srovnání s naší metodou. Metoda poskytuje velmi nízkou mez detekce a mez stanovitelnosti. Pro alfa-amanitin v moči je LOD pouze 0,22 ng/ml a pro beta-amanitin 0,20 ng/ml. V jaterní tkáni je LOD 10,9 ng/g pro alfa-amanitin a 9,7 ng/g pro beta-amanitin. LOQ je pro alfa-amanitin v moči 0,46 ng/ml a pro beta-amanitin 0,57 ng/ml a v jaterní tkáni 12,3 ng/g pro alfa-amanitin a 14,7 ng/g pro beta-amanitin.⁵²

Enjalbert et al. kvantifikovali alfa-amanitin a další toxiny v muchomůrce zelené metodou RP-HPLC s gradientovou elucí. Jako mobilní fáze byly opět použity 0,02 M octan amonný a acetonitril. Limit detekce byl pro každý toxin 10 ng/ml, což je srovnatelné s naší metodou.⁵⁵

Metoda HPLC-MS-TOF byla vyvinuta k analýze toxinů muchomůrky červené a muchomůrky zelené. Pro extrakci byly použity kolonky HLB Oasis. Byla použita kolona Ascentis Express F5. Mobilní fázi tvořila 0,1% kyselina mravenčí a metanol. Průtok byl nastaven na 0,2 ml/min. Byla použita ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Mez detekce pro alfa-amanitin byla 230 ng/ml a pro beta-amanitin 190 ng/ml. Mez kvantifikace byla stanovena na 770 ng/ml pro alfa-amanitin a 630 ng/ml pro beta-amanitin. Tyto hodnoty jsou více než desetkrát vyšší v porovnání s LOD a LOQ dosaženými naší metodou. Tato metoda je však univerzální pro stanovení devíti různých toxinů zároveň.⁵¹

Koncentrace a distribuce toxinů v muchomůrce zelené se velmi liší případ od případu. Mladé houby obsahují toxinů méně, než houby dospělé. Velká variabilita je pozorována také u stejného druhu a stáří muchomůrky nasbírané v různých regionech.⁵³

Muchomůrka zelená nasbíraná v Evropě obsahovala 2,2 mg/g alfa-amanitinu (0,22 % m/m) a 2,6 mg/g beta-amanitinu (0,26 % m/m), zatímco muchomůrka zelená nasbíraná v Severní Americe obsahovala 1,6 mg/g alfa-amanitinu (0,16 % m/m) a 1,7 mg/g beta-amanitinu (0,17 % m/m). Jednalo se o usušené houby.⁵⁴

Tento případ znázorňující poměr množství alfa-amanitinu a beta-amanitinu v muchomůrce zelené se shoduje s výsledky zjištěnými v této práci. Obsah beta-amanitinu byl vyšší než alfa-amanitinu a byl stanoven na 58 % celkového obsahu těchto dvou amanitinů.

Podobné výsledky stanovení množství alfa-amanitinu a beta-amanitinu v muchomůrce zelené jsou popsány také v práci, která se zabývá stanovením amatoxinů metodou vysokoúčinné tenkovrstevné chromatografie. Toxiny byly stanovovány v muchomůrce zelené nasbírané v Německu a ve Švýcarsku v letech 1970 - 1977. Dosažený limit detekce byl 50 ng/ml. Průměrný obsah amanitinů v muchomůrce byl 4430 mg/kg. Alfa-amanitin tvořil z této části 43 %, což odpovídá 0,20 % (m/m). Beta-amanitin byl obsažen ze 49 %, což je 0,22 % (m/m). Gama-amanitin tvořil zbývajících 8 %.⁵⁶ Tento obsah amanitinů je vyšší, než obsah amanitinů v muchomůrce zelené nasbírané v České republice v létě 2014. Tato muchomůrka obsahovala 0,0015 % (m/m) alfa-amanitinu a 0,0021 % (m/m) beta-amanitinu. Obsah toxinů se velmi liší v různých částech muchomůrky. Nejvíce jsou obsaženy v prstenci pod kloboukem a nejméně právě v klobouku, což však platí především pro falotoxiny.⁵³ V naší metodě nebyly toxiny stanovovány v usušené houbě, ale ve zmrzlé houbě. Sušením by mohl vzrůst obsah amanitinů až o jeden řád. Jak již bylo zmíněno výše, důležitá je také skutečnost, že obsah amatoxinů v různých houbách stejného druhu je velmi variabilní a závisí na mnoha faktorech. Během filtrace extraktu z houby mohlo také dojít k adsorpci amanitinů na hmotu muchomůrky a tím filtrace nemusela proběhnout kvantitativně.

Obsah amatoxinů v jednom litru polévky byl 2,76 mg pro alfa-amanitin a 1,91 mg pro beta-amanitin. Polévka však byla připravena pouze z malé muchomůrky o hmotnosti 20 g. Kdyby byla připravena z většího množství (60 g), které odpovídá jedné větší houbě, byl by obsah amanitinů srovnatelný s letální dávkou. Letální dávka pro člověka je 0,1 mg/kg. Pro člověka vážícího 60 kg je tedy letální dávka již 6 mg alfa-amanitinu. Muchomůrka o hmotnosti 100 g obsahuje v průměru 8 mg alfa-amanitinu a 5 mg beta-amanitinu. Ke smrtelné otravě stačí kolem 50 g houby, přičemž jedna plodnice váží v průměru 30 až 40 g.⁵⁷

5. ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce pojednává o jedovatých houbách rodu *Amanita*. Popisuje muchomůrkou červenou a muchomůrku zelenou a její toxiny. Zabývá se také problematikou různých typů otrav, z nichž některé jsou málo závažné, jiné více závažné a některé jsou ve velkém množství případů fatální. Poslední část teorie je rešerše o různých metodách na stanovení alfa-amanitinu, beta-amanitinu, muskarinu, muscimolu a kyseliny ibotenové. Kromě metod kapalinové chromatografie jsou zde popsány také metody plynové chromatografie nebo kapilární elektroforézy.

Experimentální část se zabývá vývojem LC-MS metody pro stanovení alfa-amanitinu a beta-amanitinu. Vzhledem k faktu, že se jedná o strukturně velmi podobné látky, mohla být bez problémů použita jedna kolona. Složení mobilní fáze a gradient byly zvoleny tak, aby se amatoxiny eluovaly v retenčním čase kolem tří minut. Bylo dosaženo krátké celkové doby analýzy, která činí 5,5 minuty. Použitím jedné metody pro stanovení obou amanitinů zároveň nedošlo k jejich úplné separaci.

Pro extrakci vzorku byla zvolena metoda SPE s WCX sorbentem. Při použití roztoku dipeptidu při ekvilibraci kolonky před extrakcí bylo dosaženo velmi dobré návratnosti amatoxinů (92 %).

Pro ověření použitelnosti metody byly extrahovány a analyzovány vzorky z muchomůrky zelené, z houbové polévky připravené z muchomůrky zelené a vzorky moče, které byly spikovány standardem alfa-amanitinu. Metoda dosáhla uspokojivých mezí detekce a mezí stanovitelnosti.

Obsah amanitinů v jednom litru polévky byl stanoven na 2,76 mg pro alfa-amanitin a 1,91 mg pro beta-amanitin. Polévka byla připravena pouze z 20 g houby. Pokud by byla připravena z množství 60 g, byl by obsah amanitinů srovnatelný s letální dávkou pro člověka vážícího 60 kg.

Obsah amanitinů v plodnici muchomůrky zelené byl nižší, než uvádí literatura. Pravděpodobně nedošlo ke kvantitativní extrakci amanitinů, kdy se část amanitinů mohla adsorbovat na pevnou fázi homogenizátu, která zůstala zachycena během přípravy vzorku na filtru.

6. LITERATURA

- 1) <http://www.myko.cz/houby/jedovate-houby/>
- 2) <http://www.biotox.cz/enpsyro/pj3ramm.html>
- 3) http://cs.wikipedia.org/wiki/Muchom%C5%AFrka_%C4%8Derven%C3%A1
- 4) http://cs.wikipedia.org/wiki/Muchom%C5%AFrka_zelen%C3%A1
- 5) Köppel C.: Clinical symptomatology and management of mushroom poisoning, *Toxicon*, **31**, 1513–1540 (1993).
- 6) http://www.wikiskripta.eu/index.php/P%C5%99ehled_intoxikace_houbami
- 7) Gonmori K., Fujita H., Yokoyama K., Watanabe K., Suzuki O.: Mushroom toxins: a forensic toxicological review, *Forensic Toxicol*, **29**, 85-94 (2011).
- 8) http://cs.wikipedia.org/wiki/Alfa_amanitin
- 9) Garcia J., Carvalho A. T. P., Dourado D. F. A. R., Baptista P., de Lourdes Bastos M., Carvalho F.: New *in silico* insights into the inhibition of RNAP II by α -amanitin and the protective effect mediated by effective antidotes, *J. Mol. Graph. Model.*, **51**, 120-127 (2014).
- 10) Brueckner, F., Cramer, P.: Structural basis of transcription inhibition by alpha-amanitin and implications for RNA polymerase II translocation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 811 (2008).
- 11) Kaya E. et al.: Dermal absorption and toxicity of alpha amanitin in mice, *Cutan. Ocul. Toxicol.*, **33**, 154-160 (2014).
- 12) http://cs.wikipedia.org/wiki/Beta_amanitin
- 13) http://en.wikipedia.org/wiki/Ibotenic_acid
- 14) Satora L., Pach D., Ciszowski K., Winnik L.: Panther cap *Amanita pantherina* poisoning, case report and review, *Toxicon*, **47**, 605-607 (2006).
- 15) Satora L., Pech D., Butryn B., Hydzik P., Balicka B.: Fly Maric (*Amanita muscaria*) poisoning, case report and review, *Toxicon*, **45**, 941-943 (2005).
- 16) Brvar M., Možina M., Bunc M.: Prolonged psychosis after *Amanita muscaria* ingestion, *Wien Klin Wochenschr.*, **118**, 294-297 (2006).
- 17) Zhang P., Chen Z., Hu J., Wei B., Zhang Z., Hu W.: Production and characterization of Amanitin toxins from a pure culture of *Amanita exitialis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **252**, 223-228 (2005).

- 18) Merová B., Staňková M., Stříbrný J., Ondra P.: LC-MS: Objektivní metoda diagnostiky intoxikací muchomůrkami, *Chem. Listy*, **106**, 831-835 (2012).
- 19) Rumack B. H., Spoerke D. G.: Handbook of mushroom poisoning: Diagnosis and treatment, 3 (1994).
- 20) Stirpe F., Fiume L.: Studies on pathogenesis of liver necrosis by alpha-amanitin – effect of alpha-amanitin on ribonucleic acid synthesis and on ribonucleic acid polymerase in mouse liver nuclei, *Biochem. J.*, **105**, 779-& (1967).
- 21) Rumack B. H., Spoerke D. G.: Handbook of mushroom poisoning: Diagnosis and treatment, 173-174 (1994).
- 22) Rumack B. H., Spoerke D. G.: Handbook of mushroom poisoning: Diagnosis and treatment, 179 (1994).
- 23) Theobald W. et al.: Pharmacological and experimental psychologic studies on 2 components of toadstool (*Amanita muscaria*), *Arzneimittel-forschung*, **18**, 311-& (1968).
- 24) Ott J., Wheaton P. S., Chilton W. S.: Fate of muscimol in mouse, *Physiological chemistry and physics*, **7**, 381-384 (1975).
- 25) Rumack B. H., Spoerke D. G.: Handbook of mushroom poisoning: Diagnosis and treatment, 236 (1994).
- 26) Zhong J.: Muscarine, imidazole, oxazole and tiazole alkaloids, *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 382-445 (2009).
- 27) Krhut, J., Mainer K., Zapletalová O.: Terapie dysfunkcí močových cest u pacientů s roztroušenou sklerózou, *Neurologie pro praxi*, **1**, 41-45 (2002).
- 28) Vyskočil F.: Acetylcholin hodný a zlý, *Vesmír*, **88**, 153 (2009).
- 29) Sullivan G., Brady L. R., Tyler V. E.: Identification of alpha- and beta-amanitin by thin-layer chromatography, *J. Pharm. Sci.*, **54**, 921 (1965).
- 30) Benedict R. G., Tyler V. E., Brady L. R., Weber L. J.: Fermentative production of amanita toxins by a strain of *Galeria marginata*, *J. Bacteriol.*, **91**, 1380-1381 (1966).
- 31) Muraoka S., Fukamachi N., Mizumoto K., Shinozawa K.: Detection and Identification of amanitins in the wood-rotting fungi *Galerina fasciculata* and *Galerina helvoliceps*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4207-4210 (1999).
- 32) Jehl F., Gallion J., Birckel P., Jaeger A., Flesch F., Minck R.: Determination of α -amanitin and β -amanitin in human biological fluids by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, **1**, 35-42 (1985).

- 33) Clarke D. B., Lloyd A. S., Robb P.: Application of liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry separation for rapid assessment of toxins in *Amanita* mushrooms, *Anal. Methods*, **4**, 1298-1309 (2012).
- 34) Robinson-Fuentes V. A., Jaime-Sanchez J.L., García-Aguilar L. et al.: Determination of alfa- and beta-amanitin in clinical urine samples by capillary zone electrophoresis, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **47**, 913–917 (2008).
- 35) Andres R. Y., Frei W., Gautschi K.: Radioimmunoassay for amatoxins by use of a rapid, tracer-based-I-125 system, *Clin. Chem.*, **32**, 1751-1755 (1986).
- 36) Homman J., Rawer P., Bleyl H. et al.: Early detection of amatoxins in human mushroom poisoning, *Arch. Toxik.*, **59**, 190-191 (1986).
- 37) Maurer H. H., Schmitt C. J., Weber A. A. et al.: Validated electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric assay for the determination of the mushroom toxins alpha- and beta-amanitin in urine after immunoaffinity extraction, *J. Chromatogr. B*, **748**, 125-135 (2000).
- 38) Defendenti C., Bonacina E., Mauroni M., Gelosa L.: Validation of high performance liquid chromatographic method for alpha amanitin determination in urine, *Forensic Sci. Int.*, **92**, 59-68 (1998).
- 39) Vlaskin D. N., Gainullina E. T., Klyuster O. V. et al.: Express method for detection of *Amanita phalloides* amanitine toxins, *B. Exp. Biol. Med+*, **141**, 119-120 (2006).
- 40) Deja S., Jawien E., Jasicka-Misiak I., et al.: Rapid determination of ibotenic acid and muscimol in human urine, *Magn. Reson. Chem.*, **52**, 711-714 (2014).
- 41) Poliwoda A., Zielinska K., Halama M., Wieczorek P. P.: Determination of muscimol and ibotenic acid in mushrooms of *Amanitaceae* by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **35**, 2593-2599 (2014).
- 42) Stříbrný J., Sokol M., Merová B., Ondra P.: GC/MS determination of ibotenic acid and muscimol in the urine of patients intoxicated with *Amanita pantheria*, *Int. J. Legal. Med.*, **126**, 519-524 (2012).
- 43) Gennaro M. C., Giacosa D., Gioannini E., et al.: Hallucinogenic species in *Amanita Muscaria* determination of muscimol and ibotenic acid by ion-interaction HPLC, *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, **20**, 413-424 (1997).
- 44) Hasegawa K., Gonmori K., Fujita H.: Determination of ibotenic acid and muscimol, the *Amanita* mushroom toxins, in human serum by liquid chromatography – tandem mass spektrometry, *Forensic toxicol*, **31**, 322-327 (2013).

- 45) Eugster C. H., Schleusener E.: Stereomere muscarine kommen in der Natur vor. Gas-chromatographische Trennung der Norbasen, *Helvetica Chimica Acta*, **52**, 708-715 (1969).
- 46) Stijve T.: Quantitative-determination of the toxins in several poisonous mushroom species by HPTLC, *Chimia*, **35**, 16-19 (1981).
- 47) Brown J. K., Malone M. H., Stuntz D. E., Tyler V. E.: Paper chromatographic determination of muscarine in *Inocybe* species, *J. Pharm. Sci.-US*, **51**, 853-& (1962).
- 48) Merová B., Ondra O., Staňková M. et al.: Determination of muscarine in human urine by electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric, *J. Chromatogr. B.*, **879**, 2549-2553 (2011).
- 49) Ginterova P., Sokolova B., Ondra P. et al.: Determination of mushroom toxins ibotenic acid, muscimol and muscarine by capillary electrophoresis coupled with electrospray tandem mass spectrometry, *Talanta*, **125**, 242-247 (2014).
- 50) Merova B., Ondra P., Stakova M.: Isolation and identification of the *Amanita muscaria* and *Amanita pantheria* toxins in human urine, *Neuroendocrinol. Lett.*, **29**, 744-748 (2008).
- 51) Yoshioka N., Akamatsu S., Mitsuhashi T. et al.: A simple method for the simultaneous determination of mushroom toxins by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *Forensic. Toxicol.*, **32**, 89-96 (2014).
- 52) Leite M., Freitas A., Azul M. A. et al.: Development, optimization and application of an analytical methodology by ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry for determination of amanitins in urine and liver samples, *Anal. Chim. Acta*, **799**, 77-87 (2013).
- 53) Vetter J.: Toxins of *Amanita phalloides*, *Toxicon*, **36**, 13-24 (1998).
- 54) Wieland T.: Peptides of poisonous *Amanita* mushrooms, Springer, New York.
- 55) Enjalbert F., Gallion C., Jehl F. et al.: Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, **598**, 227-236 (1992).
- 56) Stijve T, Seeger T.: Determination of alpha-, beta-, and gamma-amanitin by high performance thin-layer chromatography in *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Secr. from various origin., *Z. Naturforsch. C.*, **12**, 1133-1138 (1979).
- 57) http://www.biotox.cz/toxikon/makromycety/o_hptnfrtox.php

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ACN – acetonitril

AlaPhe – Alanin - Fenylalanin

EOF – elektroosmotický tok

ESI – ionizace elektrosprejem

GABA – kyselina gama-aminomáselná

IAE – imunoafinitní extrakce

LOD – mez detekce

LOQ – mez stanovitelnosti

MRM – multiple reaction monitoring

NMDA receptor – N-methyl-D-kyselina asparagová receptor

RIA – radioimunoanalýza

RNAP II – RNA-polymerasa II

SRM – selected reaction monitoring

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

TOF – time-of-flight

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Muchomůrka červená
- Obr. 2: Muchomůrka zelená
- Obr. 3: Struktura koprinu
- Obr. 4: Struktura kyseliny agarové
- Obr. 5: Struktura bufoteninu
- Obr. 6: Struktura psilocinu
- Obr. 7: Struktura muskazonu
- Obr. 8: Struktura alfa-amanitinu
- Obr. 9: Struktura beta-amanitinu
- Obr. 10: Struktura elongačního aparátu RNA-polymerázy s navázaným alfa-amanitinem
- Obr. 11: Struktura kyseliny ibotenové
- Obr. 12: Struktura muscimolu
- Obr. 13: Spontánní dekarboxylace kyseliny ibotenové na muscimol
- Obr. 14: Enzymatická dekarboxylace kyseliny glutamové na GAB
- Obr. 15: Struktura muskarinu
- Obr. 16: Chromatogram intracelulárního alfa a beta-amanitinu izolovaného z *Galeria helvoliceps*
- Obr. 17: Chromatogram extraktu z *A. phalloides*
- Obr. 18: Chromatogram vzorku moči intoxikované osoby obsahující 28 ng/ml alfa-amanitinu
- Obr. 19: Elektroforegram moči (blanku) a moči spikované alfa a beta-amanitinem
- Obr. 20: Elektroforegram extraktu z *A. muscaria* s přidavkem vnějšího standardu
- Obr. 21: Hmotnostní spektrum derivatizovaného muscimolu
- Obr. 22.: Hmotnostní spektrum derivatizované kyseliny ibotenové
- Obr. 23: Chromatogramy pro ibotenovou kyselinu a muscimol ze vzorku séra intoxikovaných pacientů
- Obr. 24: Vliv zvyšování času míchání na zeslabení signálu moči pro muscimol a pro kyselinu ibotenovou

Obr. 25: LC/MS analýza pacientovy moči

Obr. 26: Elektroforegram (MRM mód) studovaných analytů

Obr. 27: Chromatogramy vzorků získaných extrakcí z hub

Obr. 28: MS spektrum standardu alfa-amanitinu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ ve vodě

Obr. 29: MSMS spektrum standardu alfa-amanitinu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ ve vodě. Znázorněny jsou dva produktové ionty m/z 899 a m/z 463, které byly použity pro MRM záznam

Obr. 30: MSMS spektrum standardu beta-amanitinu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ ve vodě. Znázorněny jsou dva produktové ionty m/z 900 a m/z 463, které byly použity pro MRM záznam

Obr. 31: MRM chromatogram alfa-amanitinu (m/z 917) o koncentraci 100 ng/ml ve vodě

Obr. 32: MRM chromatogram beta-amanitinu (m/z 918) o koncentraci 100 ng/ml ve vodě

Obr. 33: Iontový chromatogram interního standardu kyseliny dinitrobenzoové (m/z 211,1) o koncentraci 0,2 $\mu\text{g/ml}$ ve vodě

Obr. 34: MRM chromatogram alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml při konstantním průtoku 0,6 ml/min

Obr. 35: MRM chromatogram alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml při snížení průtoku na 0,2 ml/min v době eluce alfa-amanitinu

Obr. 36: Mez detekce – iontový chromatogram alfa-amanitinu (m/z = 917) o koncentraci 5 ng/ml

Obr. 37: Mez detekce – iontový chromatogram beta-amanitinu (m/z = 918) o koncentraci 10 ng/ml

Obr. 38: Mez stanovitelnosti – iontový chromatogram alfa-amanitinu (m/z = 917) o koncentraci 30 ng/ml

Obr. 39: Mez stanovitelnosti – iontový chromatogram beta-amanitinu (m/z = 918) o koncentraci 100 ng/ml

Obr. 40: Matricový efekt – MRM chromatogram alfa-amanitinu ve vodě o koncentraci 100 ng/ml

Obr. 41: Matricový efekt – MRM chromatogram extraktu moče spikované alfa-amanitinem na koncentraci 100 ng/ml

Obr. 42: Závislost normalizované plochy píku na koncentraci alfa-amanitinu

Obr. 43: Závislost normalizované plochy píku na koncentraci beta-amanitinu

Obr. 44: MRM chromatogram neextrahovaného alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml.

Obr. 45: MRM chromatogram extrahovaného alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml za použití dipeptidu o koncentraci 1 µg/ml. Návratnost je 94 %.

Obr. 46: MRM chromatogram extrahovaného alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml bez použití dipeptidu. Návratnost je 63 %.

Obr. 47: MRM chromatogram alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml.

Obr. 48: MRM chromatogram dansylovaného alfa-amanitinu o koncentraci 100 ng/ml.

Obr. 49: MRM chromatogram alfa-amanitinu extrahovaného z muchomůrky zelené

Obr. 50: MRM chromatogram beta-amanitinu extrahovaného z muchomůrky zelené

Obr. 51: MRM chromatogram alfa-amanitinu extrahovaného z polévky z muchomůrky zelené

Obr. 52: MRM chromatogram beta-amanitinu extrahovaného z polévky z muchomůrky zelené

Obr. 53: MRM chromatogram extrahovaného vzorku moče s koncentrací alfa-amanitinu 5 ng/ml

9. SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Toxicita alfa-amanitinu pro různé živočichy při intraperitoneální aplikaci

Tab. 2: TLC amanitinů extrahovaných z *Amanita phalloides* a z *Galeria marginata*

Tab. 3: Optimalizace parametrů ESI ionizace

Tab. 4: Profil gradientu pro alfa-amanitin.

Tab. 5: Profil gradientu pro beta-amanitin.

Tab. 6: Opakovatelnost.