

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra analytické chemie

## **Příprava a testování derivatizačního činidla pro analýzu látek s fenolickou funkční skupinou hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	Robin Bomberu
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.
Konzultant práce:	Mgr. Dominika Vysloužilová

Olomouc 2022

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Robin Bomberu

Název práce: Příprava a testování derivatizačního činidla pro analýzu látek s fenolickou funkční skupinou hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Dominika Vysloužilová

Rok odevzdání práce: 2022

Anotace: Předkládaná bakalářská práce se věnuje zlepšení detekčního limitu analýzy látek s fenolickou funkční skupinou technikou HPLC/ESI-MS pomocí derivatizace a syntéze příslušného derivatizačního činidla. Teoretická část se zabývá popisem amatoxinů, jejich výskytem a mechanismem otravy a její léčby. V experimentální části a kapitole Výsledky a diskuse je popsána syntéza derivatizačních činidel a jejich následné využití při analýze  $\beta$ -amanitinu a jiných fenolických sloučenin.

Klíčová slova: amanitin, derivatizace, cystamin, 4-aminofenyl disulfid, *N*-alkylace, HPLC, hmotnostní spektrometrie, fenolické sloučeniny

Počet stran: 55

Počet stran příloh: 9

Jazyk: čeština

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Robin Bomberu

Title: Preparation and testing of a derivatizing agent for analysis of substances featuring phenolic functional group with electrospray ionization mass spectrometry

Type of thesis: bachelor's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Consultant: Mgr. Dominika Vysloužilová

The year of submission: 2022

Annotation: The bachelor thesis deals with the improvement of the detection limit HPLC/ESI-MS analysis of phenolic compounds by means of derivatization and presents synthesis of the derivatizing agents. The theoretical part describes amatoxins, their occurrence and mechanism of poisoning and its treatment. The experimental part and the chapter Results and Discussion describe the synthesis of derivatizing agents and their subsequent use in the determination of  $\beta$ -amanitin and other phenolic compounds.

Keywords: amanitin, derivatization, cystamine, 4-aminophenyl disulfide, *N*-alkylation, HPLC, mass spektrometry, phenolic compounds

Number of pages: 55

Number of pages of appendices: 9

Language: czech

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne \_\_\_\_\_

.....

Robin Bomberu

**Poděkování:**

Rád bych touto cestou poděkoval doc. Petru Fryčákovi za odborné vedení, cenné rady a připomínky a čas, který mi věnoval. Taktéž bych chtěl poděkovat Mgr. Dominice Vysloužilové za rady a pomoc v laboratoři. Dále chci poděkovat Ústavu soudního lékařství za poskytnuté materiály. V neposlední řadě děkuji za finanční podporu grantu IGA\_PrF\_2022\_023.

# OBSAH

1. ÚVOD .....	11
2. CÍLE PRÁCE.....	13
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	14
3.1. Popis amanitinů.....	14
3.2. Výskyt amanitinů.....	15
3.2.1. <i>Amanita phalloides</i> .....	15
3.3. Historie izolace amanitinů a určení molekulární struktury.....	16
3.4. Syntéza amatoxinů.....	17
3.5. Toxikokinetika amatoxinů.....	20
3.6. Popis otravy z klinického hlediska a na molekulární úrovni.....	20
3.7. Léčba.....	23
3.8. Epidemiologie otrav.....	24
3.9. Metody detekce a stanovení.....	25
3.9.1. Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.....	25
3.9.2. ELISA.....	29
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	32
4.1. Použité experimentální vybavení.....	32
4.2. Pracovní postup .....	32
4.2.1. <i>N</i> -Alkylace.....	32
4.2.2. Oxidace.....	34
4.2.3. Reakce dansylchloridu s $\beta$ -amanitinem.....	35
4.2.4. Reakce <i>N</i> -(2-(chlorosulfonyl)ethyl)- <i>N</i> -dodecyl- <i>N</i> -methyl-dodekan-1-aminium jodidu s $\beta$ -amanitinem .....	36
4.2.5. Reakce 4-(chlorosulfonyl)- <i>N,N,N</i> -trimethylbenzenaminium jodidu s $\beta$ -amanitinem .....	36
4.2.6. Reakce 4-(chlorosulfonyl)- <i>N,N,N</i> -trimethylbenzenaminium jodidu s látkami s fenolickou skupinou.....	36
4.3. Parametry HPLC/MS metod.....	37

5.	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	40
5.1.	Příprava derivatizačního činidla.....	40
5.2.	Derivatizační reakce.....	44
5.3.	Ladění parametrů ionizace a iontové optiky .....	46
6.	ZÁVĚR.....	48
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	49
8.	PŘÍLOHY .....	56

## Seznam použitých zkratek

AcOH	kyselina octová
ADC	amanitinové konjugáty protilátka-lék (z angličtiny antibody-drug conjugate)
ALT	alaninaminotransferáza
AMA1	gen kódující $\alpha$ -amanitin
AST	aspartátaminotransferáza
Bu	butyl
Cys	cystein
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropyletylamin, Hünigova báze
DMA	dimethylacetamid
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Dod	dodecyl
EIA	enzymová imunoanalýza
ELISA	heterogenní enzymová imunoanalýza (z angličtiny enzyme linked immunosorbent assay)
Et	ethyl
GST	glutathion-S-transferáza
HATU	1-[bis(dimethylamino)methylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát
HDP-101	derivát amanitinu v konjugaci protilátka-lék
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angličtiny high performance liquid chromatography)
<i>i</i> PrOH	isopropylalkohol
LDH	laktátdehydrogenáza



LFIA	imunodetekce v laterálním toku na membráně (z angličtiny lateral flow immunoassay)
LS	kapalinová chromatografie (z angličtiny liquid chromatography)
mCBPA	kyselina <i>meta</i> -chlorperoxybenzoová
Me	methyl
MELISA	heterogenní enzymová imunoanalýza s využitím magnetických kuliček (z angličtiny magnetic bead-based enzyme linked immunosorbent assay)
MIDA	<i>N</i> -methyliminodioxová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie (z angličtiny mass spectrometry)
MSDIN	označení rodiny příbuzných genů
m/z	poměr hmotnosti iontu ku jeho náboji
NCS	<i>N</i> -chlorsukcinimid
NTCP	transportér žlučových kyselin
OATP1B3	polypeptid transportující organické anionty
OATP3	polypeptid transportující organické anionty
p53	jaderný protein
RBP	podjednotky polymerázy ribonukleové kyseliny
RNA	ribonukleová kyselina
RNAP	polymeráza ribonukleové kyseliny
SPE	extrakce na pevné fázi (z angličtiny solid-phase extraction)
TBAF	tetra- <i>n</i> -butylamoniumfluorid
TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran
TMSCI	trimethylsilylchlorid
Trp	tryptofan
USA	Spojené státy americké

## Seznam příloh

*Příloha 1:* Hmotnostní spektrum reakční směsi po alkylationi cystaminu

*Příloha 2:* Hmotnostní spektrum reakční směsi po oxidaci alkylovaného cystaminu

*Příloha 3:* Hmotnostní spektrum reakční směsi po alkylationi 4-aminofenyl disulfidu

*Příloha 4:* Hmotnostní spektrum reakční směsi po oxidaci alkylovaného 4-aminofenyl disulfidu

*Příloha 5:* Chromatogram *reakční směsi* dansylchloridu s  $\beta$ -amanitinem

*Příloha 6:* Hmotnostní spektrum reakce dansylchloridu s  $\beta$ -amanitinem

*Příloha 7:* Chromatogram *reakční směsi* vanilinu a 4-(chlorsulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu

*Příloha 8:* Hmotnostní spektrum reakce vanilinu a 4-(chlorsulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu

*Příloha 9:* Chromatogram *reakční směsi* kyseliny salicylové a 4-(chlorsulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu

*Příloha 10:* Hmotnostní spektrum *reakční směsi* kyseliny salicylové a 4-(chlorsulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu

*Příloha 11:* Chromatogram  $\beta$ -amanitinu

*Příloha 12:* Hmotnostní spektrum  $\beta$ -amanitinu

*Příloha 13:* Hmotnostní spektrum kyseliny salicylové

*Příloha 14:* Chromatogram kyseliny salicylové

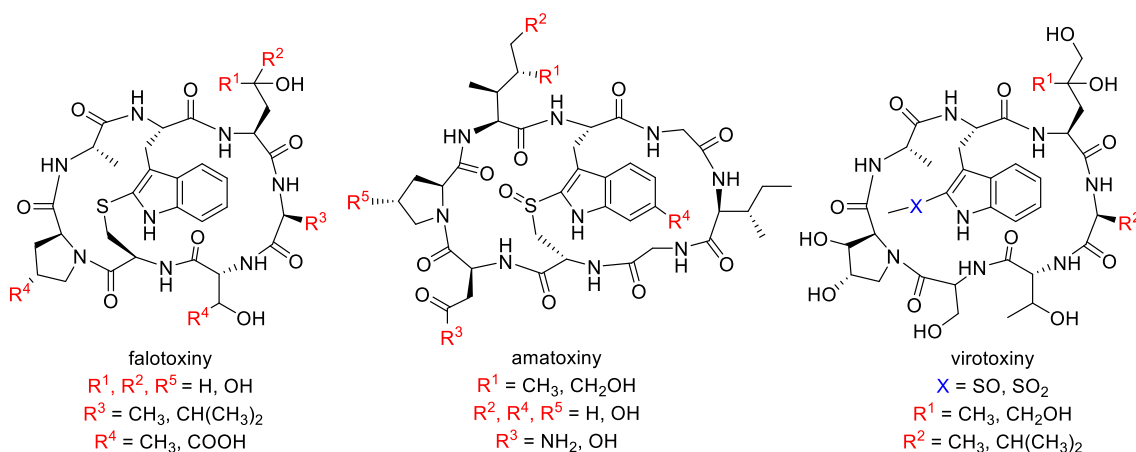
*Příloha 15:* MS/MS spektrum kyseliny salicylové

*Příloha 16:* Chromatogram vanilinu

*Příloha 17:* Hmotnostní spektrum vanilinu

# 1. ÚVOD

Muchomůrky, neboli houby rodu *Amanita*, patří díky své toxicitě mezi nejnebezpečnější houby nejen v Evropě. Hlavní toxiny vyskytující se v muchomůrkách lze rozdělit do třech skupin – rychle působící falotoxiny, pomaleji působící amatoxiny a virotoxiny (Obr. 1). Falotoxiny jsou pro savce toxické pouze při parenterálním podání, tyto sloučeniny totiž nejsou absorbovány gastrointestinálním traktem. Falotoxiny se vážají na F-aktin stabilizující aktinová vlákna, čímž zabraňují depolymerizaci mikrofilament, která způsobuje poruchu funkce cytoskeletu [1,2]. Virotoxiny nemají po perorálním podání významné toxické účinky a podobně jako falotoxiny interagují s aktinem [2,3]. Amatoxiny inhibují RNA polymerázu v jádrech jaterních buněk, čímž blokují syntézu proteinů a následně vyvolávají buněčnou smrt [3].



Obrázek 1: Struktury toxinů vyskytujících se v muchomůrkách

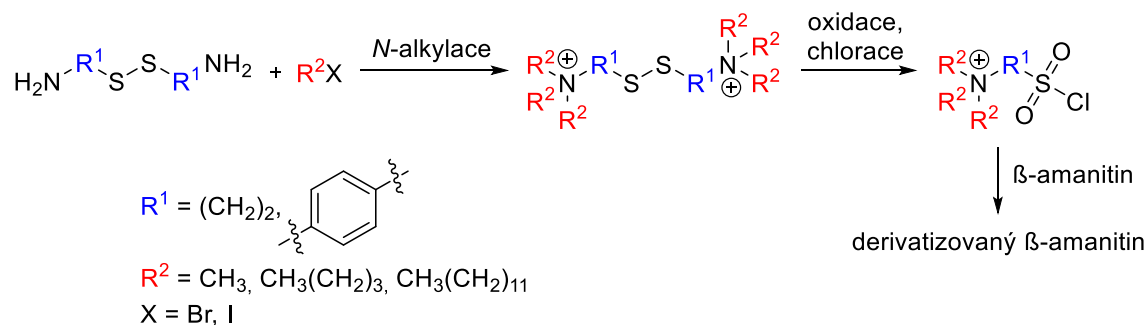
Velké riziko při otravě v důsledku konzumace hub obsahujících amatoxiny spočívá v dlouhé latentní (asymptomatické) fázi intoxikace. Po požití dochází ke vstřebávání toxinu v průběhu první latentní fáze, která je následována gastrointestinální fází otravy, vyznačující se zvracením, bolestmi břicha a průjmem. Následující druhá latentní fáze trvá až 1 den a v jejím průběhu dochází k nevratnému poškození ledvin a jater, v neléčených případech vedoucím k jejich selhání a úmrtí pacienta [4]. Z výše popsaných důvodů je potřebná rychlá a spolehlivá analytická metoda pro zjištění přítomnosti amatoxinů v těle pacienta. Amatoxiny se z krevní plazmy rychle vstřebávají, což znesnadňuje jejich stanovení ve vzorku krve. Proto jsou vyvíjeny metody dosahující co největší citlivosti, schopné zachytit i stopové množství jedu ve vzorku.

Jednou z možností analýzy amatoxinů je jejich derivatizace vhodným činidlem a následná analýza pomocí hmotnostní spektrometrie. Derivatizovaný toxin by měl

poskytovat vyšší signál a tím usnadnit jeho detekci. Předkládaná bakalářská práce navazuje na dřívější výzkum Mgr. Pauly Rovňákové pod vedením doc. RNDr. Petra Fryčáka, Ph.D. [5] a zabývá se přípravou derivatizačního činidla s kvarterní amoniovou skupinou a jeho následnou reakcí s amanitinem a dalšími látkami s fenolickou funkční skupinou. Je známo, že tetraalkylamoniové ionty poskytují vysoký ionizační výtěžek při ionizaci elektrosprejem a jejich připojení ke struktuře analytu by mohlo vést ke zvýšení citlivosti analýzy. Teoretická část práce obsahuje popis amatoxinů, jejich výskytu, mechanismu otravy a její léčby. Navazující experimentální část zahrnující výsledky a diskusi popisuje dosažené laboratorní výsledky, které jsou shrnuty v závěru. Práce je doplněna o přílohy obsahující HPLC/MS spektra připravených látek.

## 2. CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše popisující strukturu amanitinů, její určení, průběh otravy, epidemiologii otrav. Vytvoření přehledu metod pro stanovení amanitinů v biologických vzorcích za posledních 5 let.
2. Ladění parametrů HPLC/MS metody za účelem získání maximální odezvy nativní formy analytu. Příprava derivatizačního činidla a derivatizace analytu (Schéma I). Ladění parametrů metody za účelem získání maximální odezvy derivatizovaného analytu. Srovnání citlivosti detekce nativní a derivatizované formy analytu.
3. Vypracování experimentální části bakalářské práce.

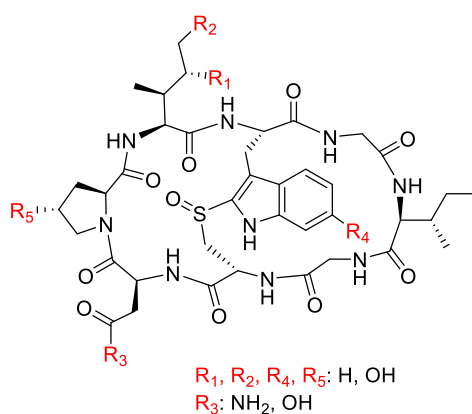


*Schéma I:* Navrhovaná syntéza derivatizačního činidla a derivatizace analytu

### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1. Popis amanitinů

Amanitiny, v literatuře též amatoxiny, jsou bicyklické oktapeptidy odvozené z jedné mateřské molekuly (Obr. 2), které se skládají výhradně z L-aminokyselin a glycinu [1]. Jednotliví zástupci amanitinů se liší pouze počtem hydroxylových skupin ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ) a amidovou, případně karboxylovou skupinou ( $R_3$ ) zbytku kyseliny asparagové. Molekula amanitinů dále obsahuje heteroatom tryptathionu, který se zde vyskytuje jako (R)-sulfoxid [6]. V rámci amatoxinů jsou zástupci  $\alpha$ -amanitin,  $\gamma$ -amanitin, amaninamid, amanulin a proamanulin klasifikovány jako neutrální amatoxiny, zatímco  $\beta$ -amanitin,  $\epsilon$ -amanitin, amanin a kyselina amanullová jsou kyselé amatoxiny (Tab. I) [4].



Obrázek 2: Obecný vzorec amatoxinů

Tabulka I: Přehled známých amatoxinů

amatoxin	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$	charakter
$\alpha$	OH	OH	NH <sub>2</sub>	OH	OH	neutrální
$\gamma$	H	OH	NH <sub>2</sub>	OH	OH	
amaninamid	OH	OH	NH <sub>2</sub>	H	OH	
amanulin	H	H	NH <sub>2</sub>	OH	OH	
proamanulin	H	H	NH <sub>2</sub>	OH	H	
$\beta$	OH	OH	OH	OH	OH	kyselé
$\epsilon$	H	OH	OH	OH	OH	
amanin	OH	OH	OH	H	OH	
amanullová k.	H	H	OH	OH	OH	

Amatoxiny mají velkou tepelnou stabilitu a jsou velice dobře rozpustné ve vodě. Kombinace těchto vlastností je činí výjimečně toxickými, protože se nezničí vařením ani sušením. Vysokou tepelnou stabilitu dokazuje i fakt, že byl zaznamenán smrtelný případ otravy i po konzumaci zmražených muchomůrek zelených. Amatoxiny jsou navíc odolné vůči degradaci enzymy a kyselinami, a proto při požití nedochází k jejich inaktivaci v gastrointestinálním traktu. Amatoxiny se navíc velmi pomalu rozkládají při skladování ve vodných roztocích v otevřených nádobách nebo při dlouhodobém vystavení slunci [4].

Nejtoxictějším zástupcem amatoxinů je  $\alpha$ -amanitin [7]. Molekulová hmotnost  $\alpha$ -amanitinu je 918,98 g/mol a teplota tání je 254 °C [8]. Za vysokou toxicitu jsou zodpovědné hydroxylové skupiny v postranních řetězcích, které se vodíkovou vazbou vážou na RNA polymerázu II (RNAPII) a způsobují tak inhibici její aktivity [9,10]. Smrtelná dávka  $\alpha$ -amanitinu je pro morče 0,05 mg/kg, pro potkana více než 2 mg/kg a pro člověka 0,1 mg/kg tělesné hmotnosti [8]. Na usmrcení dospělého člověka stačí asi 50 g syrové plodnice muchomůrky zelené [11].

V případě  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\epsilon$ -amatoxinu se letální dávka pohybuje v mezích 0,2 - 0,4 mg/kg tělesné hmotnosti. Kyselina amanullinová a její derivát amanullin jsou pak již slabší jedy se smrtelnou dávkou 20 mg/kg [8].

## 3.2. Výskyt amanitinů

Amatoxiny se nacházejí v houbách čeledi muchomůrkovitých (*Amanitaceae*) (rod *Amanita*), *Agaricaceae* (rod *Lepiota*) a *Cortinariaceae* (rod *Galerina*). Největší obsah amatoxinů mají zejména muchomůrky, jako je muchomůrka zelená (*A. phalloides*), muchomůrka jarní (*A. verna*), muchomůrka jízlivá (*A. virosa*), *A. ocreata*, *A. suballiacea*, *A. bisporigera*, *A. hygroskopica* a *A. tenuifolia*. Tyto látky jsou hlavní příčinou vysoké toxicity těchto hub, přičemž hlavní toxiny představují  $\alpha$ - a  $\beta$ -amanitin [6,7,12]. Vzhledem k tomu, že *A. phalloides* je z uvedených zástupců hub nejjedovatější a je nejčastější příčinou otrav houbami v rámci České republiky i celé Evropy, věnuje se následující podkapitola popisu právě tohoto druhu [13].

### 3.2.1. *Amanita phalloides*

*Amanita phalloides*, česky muchomůrka zelená (Obr. 2), je smrtelně jedovatá stopkovýtrusná houba. Je rozšířena zejména v Evropě, její výskyt byl ale zaznamenán i v USA, Jižní Africe, Malajsii, Chile, Mexiku, Austrálii a Indii. V uvedených oblastech byly rovněž zaznamenány případy otrav touto houbou [14]. *A. phalloides* se běžně vyskytuje ve vlhkých, zejména bukových a dubových lesích, v období od června do října. Lze ji nalézt také pod osamělými listnatými stromy a výjimečně v borovicových lesích [15]. Jedná se

o ektomykorhizní houbu, která vytváří symbiotické vztahy s různými druhy stromů, jako je buk, dub, kaštan a borovice [4]. Ve vyšších polohách roste pouze vzácně [16].



Obrázek 3: *Amanita phalloides*. Autor fotografií S. Jirásek [17].

Klobouk muchomůrky zelené má v průměru 50 až 120 mm. V mládí je polokulový až zvonový. Je spojený bílým závojem s vrcholem třeně. Později se stává plošší. Pokožka klobouku má od olivově žluté, přes žlutozelenou až po hnědě olivovou barvu. Střed klobouku je většinou tmavší než okraje. Z počátku celou plodnici obaluje plachetka, která se později trhá. V dospělosti bývá klobouk lysý. Lupeny jsou bílé až nažloutlé. Dužina má bílou až žlutozelenou barvu. Výška třeně, který je válcovitý a dole rozšířený, se pohybuje od 80 po 180 mm. Třeň bývá obvykle světlejších barev než klobouk a na jeho vrcholu se vyskytuje bílý blanitý prsten. Díky tomuto prstenu lze muchomůrka zelená odlišit od jedlých žampionů. Chuť plodnice je lahodná a nasládlá, což bylo i potvrzeno intoxikovanými pacienty. Její vůně připomíná vadnoucí růžové květy a při zasychání voní medově [18–20]. Jiné zdroje však uvádí, že v dospělosti může mít i pach syrových brambor [13].

### 3.3. Historie izolace amanitinů a určení molekulární struktury

Před více než 140 lety se izolace amanitinu stala předmětem zájmu německých, francouzských a amerických laboratoří. Žádná z proběhlých studií ovšem nevedla k získání homogenní látky, její vodný extrakt totiž vždy obsahoval sloučeninu, která se rozkládala působením kyselin i zahříváním. Tato skutečnost vedla k vyloučení přítomnosti amanitinu, jehož termická stabilita byla popsána už dříve [1]. Na začátku 20. století byly Williamem W. Fordem provedeny experimenty ke zjištění chemické struktury toxinů muchomůrek. Sloučeninou, kterou se mu povedlo získat pravděpodobně z *A. virosa*, usmrtil pomocí subkutánní dávky 0,4 mg dospělé morče. Díky dnešním znalostem víme, že obsah čistého toxinu v diskutovaném přípravku se pohyboval kolem 10 %. Získaný toxin byl Fordem pojmenován jako amanitatoxin. Dále se izolací čistého amanitinu zabýval ve 30. letech 20. století Hans A. Raab, který ve své publikaci podrobně popsal mimo jiné i dosavadní



historii výzkumu amanitinů. Amanitin v čisté formě se bohužel nepovedlo izolovat ani Raabovi [21]. Zvýšení výtěžku při izolaci se povedlo J. Renzovi, který rovněž dokázal, že tento toxin lze extrahovat z vody do butanolu. Roku 1937 se v Mnichově podařilo F. Lynenovi a U. Wielandovi pomocí frakční extrakce vodného roztoku toxinu butanolem rozdělit směs na dvě části – první část obsahovala toxin působící během několika hodin a druhá část obsahovala složky s delší dobou působení. Po přečištění rychleji působící části směsi byla zkoumaná látka krystalizována a pojmenována jako falloidin [22]. Čistý amanitin se prostřednictvím adsorpce podařilo izolovat až v roce 1941 H. Wielandovi, R. Hallermayerovi a W. Zilgovi [1]. Pomocí nově vyvinuté metody elektroforézy na filtračním papíru byly tehdy objeveny dvě složky krystalického amatoxinu – neutrální složka, nyní známá jako  $\alpha$ -amanitin, a kyselá složka, která migrovala směrem k anodě, nyní uváděná pod názvem  $\beta$ -amanitin [21]. Obecná struktura amanitinu byla objasněna v roce 1966 T. Wielandem a U. Gebertem. Úplný vzorec byl ovšem znám až v roce 1968 díky H. Faulstichovi et al [23].

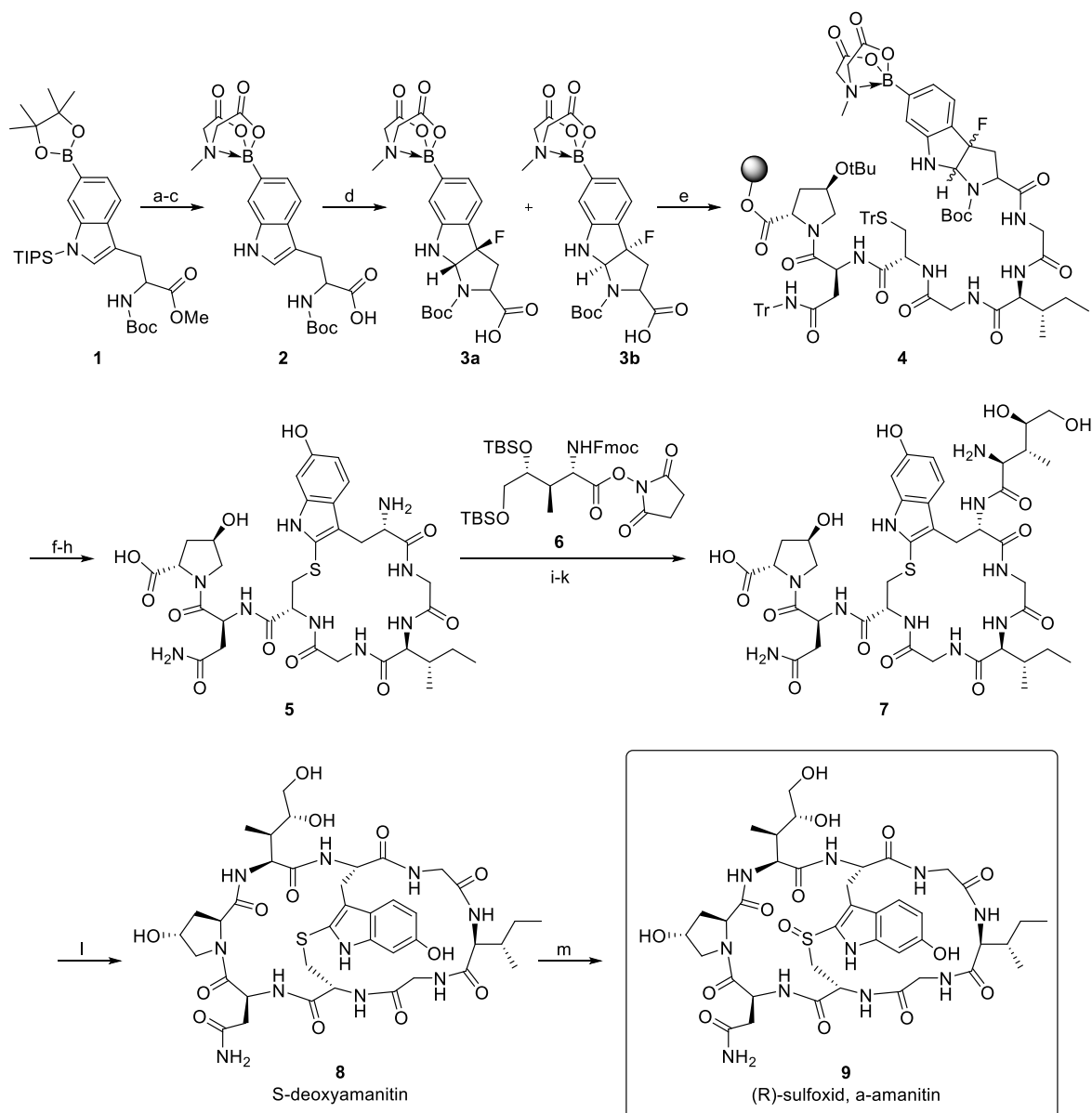
Pro analytické stanovení amatoxinů byla používána papírová a tenkovrstvá chromatografie. Pro vizualizaci byl jako detekční činidlo použit roztok cinnamaldehydu v methanolu a kyselina chlorovodíková. Při postřiku chromatogramu roztokem cinnamaldehydu a následné expozici chlorovodíku reagují amatoxiny za vzniku intenzivního červenofialového zbarvení a falotoxiny za vzniku modrého. Další metodou detekce amatoxinů byla jejich reakce s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na papíře obsahujícím lignin za vzniku zelenomodrého zbarvení [21].

### 3.4. Syntéza amatoxinů

Totální syntéza cyklických peptidů vyskytujících se v muchomůrkách má dlouhou historii, která sahá až do 50. let 20. století. Největší překážkou byl v té době cyklizační krok, který se povedlo provést E. Munekeovi [1,24] a který mu umožnil syntézu faloidinu, jednoho z falotoxinů. Vzhledem k tomu, že struktura a tudíž i syntéza jednotlivých zástupců amatoxinů je velice podobná, kapitola diskutuje pouze syntézu biologicky nejvýznamnějšího a v rámci této práce zkoumaného  $\alpha$ -amanitinu. Úspěšná totální syntéza byla publikována roku 2018 výzkumnou skupinou D. M. Perrina, která překonala všechny obtížně proveditelné kroky zkoumané syntézy. Výtěžky totálních syntéz cyklických peptidů jsou obvykle velmi malé kvůli mnoha funkčním skupinám a chirálním centřům, které molekuly obsahují [2]. Syntetické výzvy při přípravě  $\alpha$ -amanitinu sestávají z přípravy 6-hydroxytryptathioninu, ke které je potřebná selektivní oxidace, dále enantioselektivní syntéza (2S,3R,4R)-4,5-dihydroxyisoleucinu a diastereoselektivní sulfoxidace.

Výchozí sloučenina **1** (Schéma II na následující straně) byla postupně podrobena desilylaci a deesterifikaci a následně převedena na MIDA boronátový ester **2** (*N*-methyliminodioxová kyselina, MIDA, vystupuje jako trojvazný ligand a váže se na atom boru ve sloučenině). Získaná látka je podrobena cyklizaci v přítomnosti 1-fluor-2,4,6-trimethylpyridinium triflátu za vzniku sloučeniny **3** jako neoddělitelného páru diastereomerů. Takto získaná diastereoizomerní směs byla přímo navázána na hexapeptid na pevné fázi za vzniku heptapeptidu **4**. Následující zpracování pomocí kyselina trifluoroctové (TFA) a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> vyústilo současně v deprotekcii, odštěpení z pryskyřice a tvorbu dvou produktů vázaných tryptathioninem – MIDA boronátu a kyseliny boronové. Po převedení veškerého produktu na kyselinu boronovou došlo k oxidaci látky na heptapeptid **5**, který v dalším kroku reagoval s (2*S*,3*R*,4*R*)-4,5-dihydroxyisoleucinem **6**, připraveným jedenácti kroky v rámci druhého stupně popisované syntézy. V následujících dvou deprotekčních krocích byla získána látka **7**, která byla cyklizována za vzniku *S*-deoxyamanitinu **8**. Posledním krokem reakce byla diastereoselektivní sulfoxidace, v průběhu které dochází ke vzniku (*R*)- a (*S*)-sulfoxidu, přičemž přírodní  $\alpha$ -amanitin je (*R*)-sulfoxid a je asi 10krát toxičtější než (*S*)-sulfoxid. Za účelem přednostního zisku  $\alpha$ -amanitinu byla jako objemnější oxidační činidlo použita *meta*-chlorperoxybenzoová kyselina (*m*CBPA) [25].

Další metodu pro syntézu  $\alpha$ - a  $\beta$ -amanitinu představil roku 2020 C. Müller a kol., který přistoupil jiným způsobem jak k syntéze dihydroxyisoleucinu **6**, tak k tvorbě tryptathionového můstku, ke které bylo využito fotooxygenace. Tato metoda je mírnější a bezpečnější při provedení syntézy ve větším měřítku. Výzkumná skupina představila i alternativní metodu využívající komerčně dostupnějších prekurzorů. K závěrečné sulfoxidaci bylo použito stejného činidla jako v případě Perrinova postupu. Müllerova metoda byla vyvíjena s cílem umožnit komerční syntézu  $\alpha$ -amanitinu a tím zpřístupnit tuto látku pro vývoj a výzkum amanitinových konjugátů protilátka-lék (ADC) [26]. Dosud zkoumané deriváty ADC poskytují velmi slibné výsledky jako vysoce účinná a selektivní protinádorová terapeutika [27]. Jako příklad lze uvést derivát s označením HDP-101, který je aktuálně podroben první fázi klinických testů, které jsou prováděny za účelem zhodnocení bezpečnosti, farmakokinetiky a účinnosti zkoumané látky u pacientů s poruchami plazmatických buněk včetně mnohočetného myelomu [28].



**Schéma II:** Totální syntéza  $\alpha$ -amanitinu - činidla a podmínky: (a) TBAF, THF, 19–21 °C, 30 min, 74%; (b) LiOH, 1:1 THF/H<sub>2</sub>O, 4 °C, 4 h; (c) N-methyliminodictová kyselina, DMSO, 110 °C, 16 h, 25%; (d) 1-fluor-2,4,6-trimethylpyridinium triflát, THF, 65 °C, 4 h, 85%; (e) **3** navázán přímo na hexapeptid na pevné fázi za vzniku heptapeptidu; (f) 1:1 TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 19–21 °C, 1 h, 70%; (g) KOH, EtOH, aceton, 19–21 °C, 5 min; (h) *m*CPBA, EtOH, 0–4 °C, 5 min, 58%; (i) DIPEA (do pH ~8.5), DMF, 19–21 °C, 48 h; (j) Et<sub>2</sub>NH, DMF, 19–21 °C, 2 h; (k) TBAF a AcOH do pH ~5, DMF, 19–21 °C, 1 h; (l) HATU, DIPEA (do pH ~9), DMA, 19–21 °C, 2 h, 15%; (m) *m*CPBA, 2:1 *t*PrOH/EtOH, 78% pro oba diastereoizomery [25].

Dalším zkoumaným přístupem k přípravě cyklopeptidů, jako je amanitin, je studium biosyntézy metabolitů toxických hub. Bylo zjištěno, že  $\alpha$ -amanitin je v houbách syntetizován

na ribozomech [29]. Ačkoliv konkrétní biosyntetické cesty nejsou známy, základní proces vzniku  $\alpha$ -amanitinu lze znázornit na schématu III. Gen kódující  $\alpha$ -amanitin AMA1 patří do velké rodiny příbuzných genů označovanou jako MSDIN rodina.  $\alpha$ -Amanitin je syntetizován jako 35-aminokyselinový proprotein, který musí posléze projít štěpením, dalšími posttranslačními modifikacemi, včetně cyklizace, tvorby Trp-Cys křížového můstku, hydroxylace a sulfoxidace [2,29].

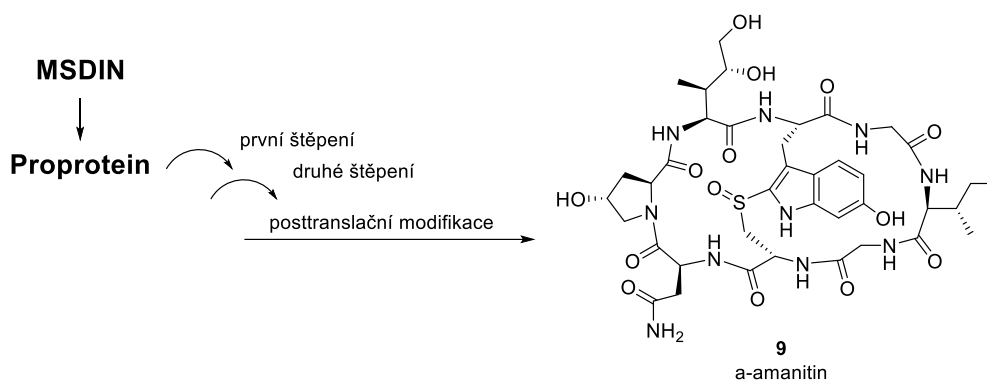


Schéma III: Biosyntéza  $\alpha$ -amanitinu [2].

### 3.5. Toxikokinetika amatoxinů

Ze všech amatoxinů jsou nejvíce studovány  $\alpha$ -amanitin a  $\beta$ -amanitin. Amanitiny jsou absorbovány střevní sliznicí a dopraveny do jater vrátnicovou žílou [30]. Amatoxiny se neváží na plazmatické bílkoviny a jsou přítomné v plazmě v nízkých koncentracích prvních 36 hodin od intoxikace. Koncentrace amatoxinů v plazmě bývá 10x až 100x nižší než v moči [31,32]. Amatoxiny nepodléhají metabolismu [33] a až 80 % těchto toxinů je vyloučeno močí. Nejvyšší koncentrace amatoxinů v moči je 48–72 hodin od požití hub a detekovatelné jsou až do 5. dne [31]. Eliminace začíná už po 90 minutách od intoxikace [34]. Díky studiím kinetiky amatoxinů na psech bylo zjištěno, že se jejich distribuční objem blíží objemu mezibuněčnému prostoru. Celková clearance je podobná clearance kreatininu [35], který vzniká ve svalcích a jeho hodnoty v krevním séru a moči se využívají pro stanovení funkce ledvin. Clearance kreatininu závisí na množství svalové hmoty [36]. Amatoxiny, které nebyly vstřebány gastrointestinálním traktem jsou vyloučeny stolicí [31]. Malé koncentrace amatoxinů se eliminují žlučí [37] a enterohepatální cirkulací se vrací zpět do jater [38].

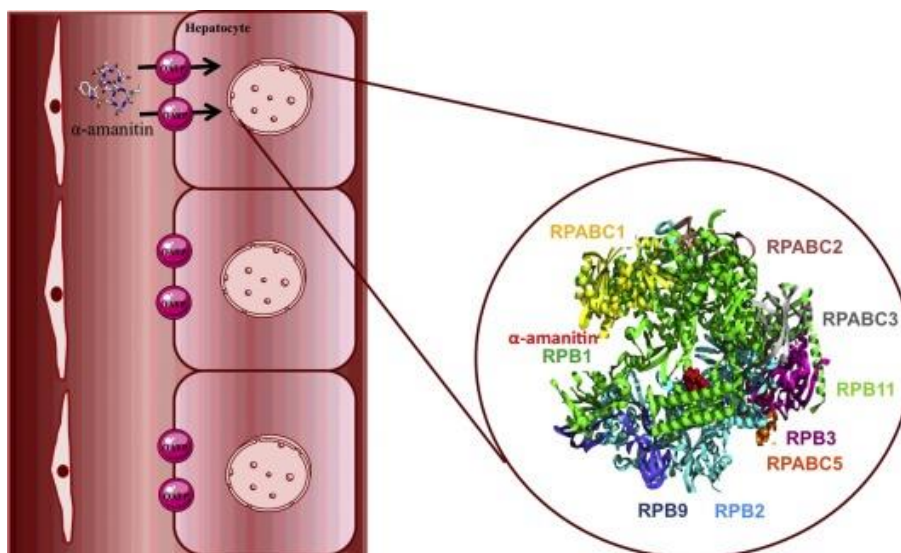
### 3.6. Popis otravy z klinického hlediska a na molekulární úrovni

Otrava *A. phalloides* se po požití vyznačuje dlouhým latentním obdobím, které obvykle trvá 8 až 12 hodin, v extrémních případech až 36 hodin. Během této doby se neprojevují žádné příznaky intoxikace. Následuje gastrointestinální fáze otravy s příznaky

jako jsou bolesti břicha, zvracení a vodnatý průjem podobný jako u cholery, což vede k dehydrataci a hypovolemii. Současně se projevuje hypoglykemie, horečka, nerovnováha elektrolytů a vlivem dehydratace může dojít až k selhání ledvin. Tato fáze obvykle trvá 1 až 2 dny [4,39]. Následující fáze je opět bezpříznaková s trváním od 12 do 24 hodin. Během tohoto období se mohou zhoršovat funkce ledvin a jater. Vznikají jaterní léze, které jsou doprovázeny zvýšenou koncentrací aspartátaminotransferázy (AST), alaninaminotransferázy (ALT) a laktátdehydrogenázy (LDH) v séru [4]. S vyšší koncentrací jaterních enzymů je rovněž narušena srážlivost krve, což může vést k vnitřnímu krvácení. V poslední fázi, projevující se 36–84 hodin od požití daných hub, se rozvíjí nekróza jater. Tento jev je způsoben postupným růstem hladin jaterních transamináz, LDH a bilirubinu v séru. Selhání jater může u pacienta způsobit encefalopatii a kóma, dále se může rozvinout žloutenka, oligurie, delirium a hepatorenální syndrom. Pokud není možná rychlá transplantace jater, pacient obvykle umírá po 7 až 10 dnech po intoxikaci [14,39,40]. Úmrtnost u dospělých pacientů se pohybuje okolo 20 %, u dětí dokonce převyšuje 50 % [41,42].

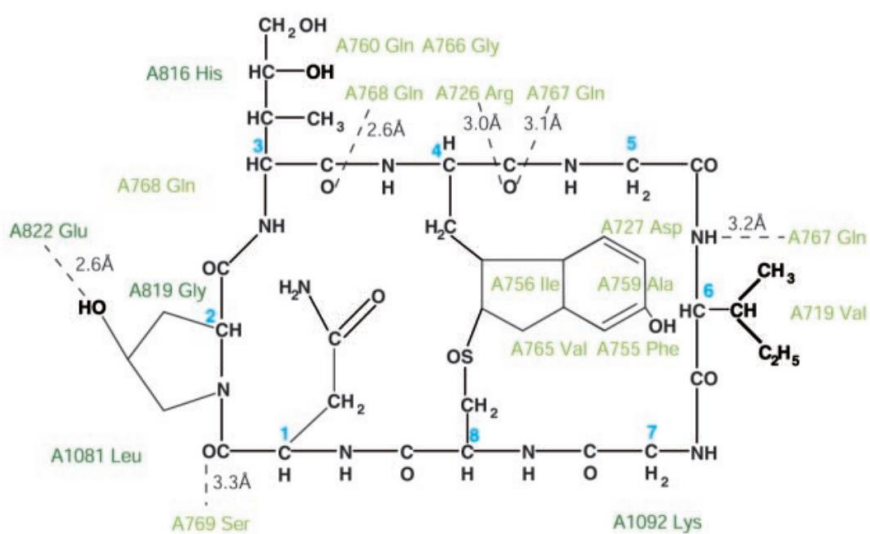
Amanitin je dopraven do hepatocytů pomocí polypeptidu transportujícího organické anionty (OATP3) [43]. Tyto polypeptidy transportují endogenní sloučeniny, jako jsou hormony štítné žlázy, žlučové kyseliny, steroidy a prostaglandiny, z mezibuněčného prostoru dovnitř buňky [43,44]. OATP3 je lokalizován v jaterních sinusoidách [45]. Dalším důležitou roli ve vychytávání amanitinu v játrech hraje transportér žlučových kyselin NTCP (natriumtaurocholát-kotransportující polypeptid) [46]. NTCP je protein závislý na sodíku umístěný v hepatocytech přenášející sodík a taurocholát v poměru 2:1 [47,48].

Hlavním mechanismem toxického účinku amatoxinů je nekovalentní vazba s RNA polymerázou II a III (RNAPII a RNAPIII) v jádrech jaterních buněk a následná inhibice těchto enzymů [4,49] RNA polymerázy se nachází v jádrech všech eukaryotických buněk a mají za úkol transkripci DNA [21]. Jádra obsahují 3 různé RNA polymerázy – I, II a III. RNAPI syntetizuje prekurzory ribozomálních RNA (rRNA), RNAPII syntetizuje prekurzory messengerové RNA (mRNA) a RNAPIII vyrábí prekurzory transferové RNA, rRNA a malých cytosolových RNA [50].  $\alpha$ -Amanitin s RNAPII tvoří velmi pevný komplex (Obr. 4) v poměru 1:1 ( $K_d=10$  nmol/l), slabší komplex tvoří i s RNAPIII ( $K_d=1$   $\mu$ mol/l) [50]. S RNAPI amanitin netvoří vazbu ani při vysokých koncentracích [21].



Obrázek 4: Zjednodušený model transportu amanitinu (vlevo nahoře) do jaterních buněk a jeho komplex s RNA polymerázou 2 (vpravo) [4].

Vazebné místo amanitinu se nachází mezi největšími podjednotkami RNA polymerázy II – RPB1 a RPB2. Amanitin tvoří s podjednotkou Rpb1 několik vodíkových vazeb (Obr. 5) [10]. Poloha navázaného toxinu znemožňuje konformační změnu RNAPII a elongace RNA je tak inhibována [4]. Po vytvoření komplexu stále probíhá jeden krok elongace a to tvorba fosfodiesterové vazby. Translokace rostoucího řetězce RNA do katalytického místa RNAPII, která následuje po elongaci, už je amanitinem blokována [1,51]. Následně je z důvodu ireverzibilní inhibice způsobena degradace podjednotky RPB1 [49].



Obrázek 5: Schéma vazeb  $\alpha$ -amanitinu s podjednotkou RPB1, čárkovaně naznačeny vodíkové vazby [10].

Výrazný pokles produkce mRNA vlivem inhibice RNAPII má za následek zastavení syntézy bílkovin [4]. Amanitin aktivuje protein p53, který se uvolňuje při poškození DNA a indukuje buněčnou smrt. Molekuly proteinu p53 se akumulují, přemisťují do mitochondrií a způsobují apoptózu buněk [52]. Smrt buněk vyvolaná působením amanitinu může být důležitý prvek při poškození jater [53].

### 3.7. Léčba

Do hodiny od požití toxických hub se doporučuje výplach žaludku vlažným fyziologickým roztokem k odstranění zbylých plodnic a zabránění dalšímu vstřebání toxinů. Po této době se jeho účinnost rychle snižuje v důsledku distribuce amanitinu do těla. Vzhledem k latentní fázi na začátku intoxikace se většinou pacienti nedostanou do nemocnice včas, tak, aby byl výplach účinný [54]. Po laváži žaludku je důrazně doporučeno přerušit enterohepatální cirkulaci amanitinu podáváním vysokých dávek aktivního uhlí. Doporučuje se podávat 1 g/kg tělesné hmotnosti ve 4 hodinových intervalech 24–48 hodin. Aktivní uhlí tvoří s amatoxiny inaktivní komplexy [55]. Současně je nutné podávání elektrolytů k předejití iontové dysbalance a dehydratace způsobené průjmy a zvracením [56]. Důležitá je i korekce acidobazické nerovnováhy. Vzhledem k rychlé clearance amatoxinů z krve nejsou mimotělní eliminační metody jako jsou hemodialýza nebo hemoperfuze dostatečně účinné. Navzdory tomu, že amatoxiny mohou být detekované v moči i 4 dny od požití hub, se nedoporučuje ani forsírovaná diuréza. Ke zvýšení renální eliminace amatoxinů je považován za dostatečný výdej moči 100–200 ml/hod 4–5 dní od intoxikace [56,57].

Jeden z nejvíce používaných léků při otravě amatoxiny byl benzylpenicilin (penicilin G). Bylo předpokládáno, že benzylpenicilin inhibuje transportní polypeptid pro organické anionty 1B3 (OATP1B3), který se nachází v plazmatické membráně. Experimenty ukázaly, že benzylpenicilin je pouze substrát OATP1B3 a tak tyto membránové transporty neinhibuje [43,56,57]. Od používání vysokých dávek penicilinu G se v současné době upouští nejen kvůli nízkému účinku, ale i častým alergickým reakcím a vedlejšími účinkům jako jsou elektrolytická dysbalance, neurotoxické příznaky u pacientů s nervovým onemocněním, křeče a granulocytopenie [57–59].

Dále je možné podávat *N*-acetylcystein, který se v těle metabolizuje na cystein potřebný pro syntézu glutathionu (glutathion-S-transferáza, GST), podporujícího detoxikaci, vychytávajícího volné radikály a pomáhajícího při oxidačním stresu. *N*-acetylcystein se podává nitrožilně v iniciální dávce 150 mg/kg v 5% roztoku glukózy, následně pak po dobu 3 dnů v dávce 300 mg/kg/den [60,61].

Za látku s nejvyšším efektem a nejvíce snižující mortalitu při otravě muchomůrkou je považován silibinin. Úmrtnost při podávání samotného silibininu je nižší než 10 %, oproti léčbě silibininem v kombinaci se penicilinem, kdy se pohybuje kolem 20 % [62]. Silibinin je flavonolignan nacházející se v ostropestřci mariánském (*Silybum marianum*) [63]. Má hepatoprotektivní účinky – během enterohepatální cirkulace amatoxinu inhibuje jeho vychytávání kompetitivní inhibicí transportního systému OATP1B3, povzbuzuje syntézu proteinů v poškozených jaterních buňkách, je protizánětlivý a snižuje produkci volných kyslíkových radikálů. Pokud je silibinin pacientovi podán do 48 hodin, předpokládá se pouze mírné poškození jater. Po pozdějším podání léku je větší pravděpodobnost jaterního selhání [43,62]. Podání se doporučuje intravenózně, v rozsahu 20–50 mg/kg/den, rozděleně do čtyř dvouhodinových infuzí. Léčba by měla být zahájena co nejdříve, i před určením diagnózy [60].

V případě selhání jater je pro přežití pacienta potřebná jejich transplantace. Hodnocení prognózy a indikace urgentní transplantace jater se provádí na základě tzv. King's College kritérií. Cílem těchto kritérií je včas identifikovat nemocné s vysokou pravděpodobností úmrtí před fatálním zhoršením stavu a předejít transplantaci jak u pacienta s postačující pravděpodobností na spontánní uzdravení, tak i u pacienta s nízkou pravděpodobností na příznivý průběh léčby po transplantaci [60,64]. Tato kritéria pro intoxikaci amatoxiny, tedy pro jaterní selhání nezpůsobené paracetamolem, však nejsou vždy zcela přesná [54,56,65–67]. Podle King's College kritérií musí pacient splňovat tyto podmínky: protrombinový čas > 100 s nebo 3 z těchto kritérií, věk < 10 nebo > 40 let, protrombinový čas > 50 s, bilirubin > 300  $\mu\text{mol/l}$  a žloutenka minimálně 7 dní před nástupem encefalopatie [56,64]. Poslední z uvedených podmínek je nejméně směrodatná, jelikož většina pacientů umírá do 9 dne od intoxikace [54].

### 3.8. Epidemiologie otrav

V letech 1990-1991 se v Česku intoxikovalo houbami obsahujícími amatoxiny 73 osob. Z toho se u 35 lidí jednalo o otravu muchomůrkou zelenou. Ani u jednoho pacienta nebyla použita detoxikace aktivním uhlím a naopak u všech byla provedena hemoperfuze. 7 z 35 lidí intoxikovaných muchomůrkou zelenou na následky otravy zemřelo [57].

Podle statistik Ústavu soudního lékařství v Olomouci se v letech 2014 a 2016 intoxikovali 3 lidé muchomůrkou zelenou. Případ otravy z roku 2014 byl fatální – byl prokázán  $\alpha$ -amanitin ve vzorku moči a  $\beta$ -amanitin v jaterní tkáni. V jednu ze dvou případů z roku 2016 byly oba toxiny nalezeny v moči, v druhém případě byl v moči nalezen pouze  $\beta$ -amanitin. Všechny vzorky byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.



Toxikologická centra ve Spojených státech evidují od roku 1999 do roku 2016 133 700 případů otrav houbami, z toho je pouze 832 připisováno cyklopeptidickým toxinům. U velkého množství případů (86 %) nebyla zjištěna příčina otravy. Amanitiny jsou zodpovědné za 30 celkových 52 smrtelných otrav [68].

### 3.9. Metody detekce a stanovení

#### 3.9.1. Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Kapalinová chromatografie (LC, z angličtiny liquid chromatography) je separační metoda využívající rovnovážnou distribuci mezi dvěma fázemi. Vzorek je vnášen mezi kapalnou mobilní a stacionární fází, tyto fáze jsou vzájemně nemísitelné. Separovaná směs unášená mobilní fází protéká kolonou, případně vzlíná po ploše a na základě různého zadržování jednotlivých látek stacionární fází dochází k dělení směsi na její složky. Podle způsobu provedení dělíme metody kapalinové chromatografie na kolonové a planární (plošné). V případě kolonové chromatografie je stacionární fáze zafixována v úzké trubici (koloně), kterou protéká mobilní fáze a separace je pak založena na různých principech, jako příklady lze uvést rozdělovací, adsorpční, gelová permeační, iontově výměnná nebo afinitní kapalinová chromatografie. Využití jednotlivých metod závisí zejména na charakteru stanovovaných látek [69,70].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z angličtiny high performance liquid chromatography) je nejčastěji používaným typem chromatografie. Využívá pevnou stacionární fází s velmi malými částicemi a vysoký tlak pro protlačení mobilní fáze přes kolonu s dostatečným průtokem. Chromatograf pro HPLC je složen ze zásobníků mobilní fáze, odplyňovače, směšovacího zařízení, čerpadla s co nejmenším kolísáním průtoku, dávkovacího ventilu (nejčastěji dávkovací smyčky) a náplňové kolony. Separované složky vytékající z kolony zpravidla postupují do detektoru, který může být například fotometrický, refraktometrický, fluorescenční, elektrochemický nebo hmotnostní [69,70].

Hmotnostní spektrometrii (MS, z angličtiny mass spectrometry) lze rovněž zařadit mezi separační metody. Molekuly analytu jsou nejprve ionizovány a zplyňovány a získané ionty jsou podle hodnoty poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) separovány. Po rozdělení dochází k dopadu iontů na převodník, který ionty mění na elektrický signál. Získané hmotnostní spektrum je poté závislost zastoupení iontů na podílu  $m/z$ . Hmotnostní spektrometr lze rozdělit na tři základní části – iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Mezi iontové zdroje patří indukčně vázané plazma, elektronová a chemická ionizace, elektrosprej, chemická ionizace za atmosférického tlaku nebo laserová desorpce. Použitá technika ionizace je volena opět dle typu analytu a závisí na ní vzhled hmotnostního



Jiná metoda pro stanovení  $\alpha$ -amanitinu v krevním séru a játrech pomocí LC/MS/MS/MS byla použita M. S. Filigenzim a kol. Vzorky séra byly zbaveny proteinů vysrážením acetonitrem a vzorky jater byly homogenizovány ve vodném roztoku acetonitrilu. V obou případech byl následně acetonitril z roztoku vyextrahován dichlormethanem. Poté byly oba vzorky separovány na SPE C18 katexové koloně. Analýzy vzorků amanitinu byly provedeny na chromatografické koloně Synergi Polar-RP 80 Å (100 mm x 4,6 mm, 4  $\mu$ m) ve spojení s hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí. Mobilní fáze se skládala z 0,01 mol/l octanu amonného v 0,1% (v/v) vodném roztoku kyseliny mravenčí a 0,01 mol/l octanu amonného v 0,1% (v/v) roztoku kyseliny mravenčí v methanolu. Analýza probíhala s gradientovou elucí s nastavením na 60 % methanolického roztoku prvních 5 minut, další 2 minuty 90 % a následně 8 minut opět 60 %. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. Na jednu analýzu byl použit 1 ml vzorku séra. Délka analýzy se pohybovala kolem 15 minut. Kalibrační křivky byly lineární v rozmezí 1–50 ng/ml matrice s koeficientem determinace  $r^2 > 0,9900$ . Mez stanovitelnosti byla 1 ng/g matrice v játrech i séru a byla vypočítána i mez detekce na 0,26 ng/g matrice séra a 0,50 ng/g matrice jater [72].

Cílem studie T.P. Bambauera a kol. bylo vyvinout a validovat metodu kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC/HRMS/MS) ke kvantitativnímu i kvalitativnímu stanovení amanitinů ve vzorcích lidské plazmy. Příprava vzorku byla totožná s postupem v předchozí studii. Nejprve byly vysráženy proteiny z plazmy acetonitrem, poté byla provedena extrakce dichlormethanem a následovala extrakce na pevné fázi. Takto připravené vzorky plazmy byly analyzovány na koloně Thermo Fisher Accucore PhenylHexyl column (150 mm x 2,1 mm, 2,6  $\mu$ m). Mobilní fáze se skládaly z přečištěné vody, pufované 8 mmol/l octanem amonným, okyselené 0,05% (v/v) kyselinou octovou a stabilizované 5 ppm kyseliny askorbové (A) a acetonitrilu s methanolem v poměru 1:1 s 1 % (v/v) přečištěné vody, 4 mmol/l octanu amonného a 0,05 % (v/v) kyseliny octové (B). Gradientová eluce a průtok mobilní fáze jsou zobrazeny v tabulce II. Hmotnostní spektra byla měřena v pozitivním módu MS s orbitální pastí jako detektorem. Jako interní standard byl použit  $\gamma$ -amanitin(methyl)ether. Detekční limit byl 20 pg/ml a kalibrační křivka byla lineární v rozmezí 20 pg/ml - 2000 pg/ml s  $r^2 = 0,9973$ . Na jednu analýzu, která trvala 15,5 minuty, bylo použito 2,5 ml krevní plazmy. Validovaná metoda byla aplikovaná na analýzu vzorků plazmy pacientů intoxikovaných amanitinu a také by mohla být použita, když není dostupná moč jako matrice [73].

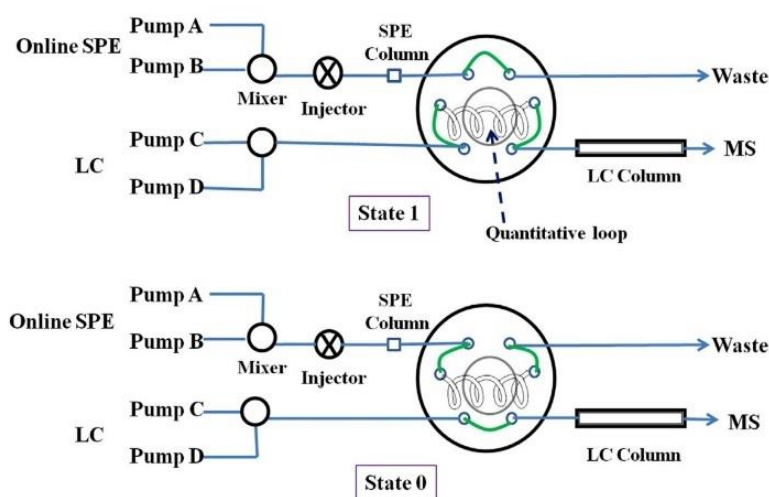
Tabulka II: Průtok a složení mobilní fáze v průběhu analýzy [73]

Krok	Čas [min]	Průtok mobilní fáze [ml/min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
1	0,00	0,30	99,0	1,0
2	1,00	0,30	99,0	1,0
3	3,00	0,20	85,0	15,0
4	10,00	0,20	70,0	30,0
5	12,50	0,20	1,0	99,0
6	14,00	0,30	1,0	99,0
7	14,00	0,30	99,0	1,0
8	15,48	0,30	99,0	1,0
9	15,50	0,05	99,0	1,0

Ve studii X.-M. Xu byla vyvinuta metoda na stanovení amanitinů v plazmě pomocí online extrakce na pevné fázi s HPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií s trojitým kvadrupólem (online SPE-LC/MS/MS). Vzorky plazmy byly připraveny vysrážením proteinů roztokem obsahujícím kyselinu mravenčí, acetonitril a methanol. Extrakce na pevné fázi byla provedena na koloně Shimadzu ODS (2.1 mm × 5 mm, 5 μm) s průtokem mobilních fází 0,5 ml/min s gradientovou elucí. Mobilní fáze sestávaly z 5 mmol/l roztoku kyseliny mravenčí a methanolu. Použitá kolona pro kapalinovou chromatografii byla kolona Waters XBridge BEH C18 (150 mm x 3 mm, 2.5 μm). Průtok mobilních fází o složení methanol (A) a voda (B) byl nastaven na 0,4 ml/min. Gradientová eluce je uvedena v tabulce III. Regulace tlaku a průtoku byla zajištěna smyčkou s rychlým přepínáním ventilu. Smyčka sbírala z online SPE kolony eluent obsahující toxiny (Obr. 7). Meze detekce pro α- i β-amanitin byly 20 pg/ml. Linearita byla v rozmezí od 50 pg/ml do 20 ng/ml a korelačním koeficientem  $r > 0,99$ . Na jednu 14 minutovou analýzu bylo použito 100 μl plazmy. Vyvinutá metoda byla aplikovaná na analýzu 18 vzorků plazmy pacientů s otravou amatoxiny a dokáže identifikovat tyto toxiny v plazmě až 40 hodin od intoxikace. [74]

Tabulka III: Složení mobilních fází během analýzy [74]

Krok	Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
1	0,0	5	95
2	4,0	5	95
3	6,5	65	35
4	10,0	65	35
5	10,5	90	10
6	12,0	90	10
7	12,5	5	95
8	14,0	5	95



Obrázek 7: Schéma zapojení online SPE-LC-MS

### 3.9.2. ELISA

Heterogenní enzymová imunoanalýza (ELISA, z angličtiny Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) je imunochemická bioanalytická metoda založená na specifické interakci antigenu s protilátkou. Použití biospecifické reakce umožňuje citlivé rozpoznání analytu v komplexních biologických vzorcích. ELISA je typem enzymové imunoanalýzy (EIA), skupiny metod využívajících pro kvantifikaci nebo detekci analytu enzymovou reakci. Často se jedná o enzymem zprostředkovanou barevnou změnu analyzované směsi. Enzym je při EIA kovalentně vázán na některý z imunoreaktantů. V případě ELISA je jeden z reaktantů zakotven na pevné fázi, kterou mohou být stěny jamek mikrotitračních destiček (nejčastěji), stěny zkumavek, membrány nebo tyčinky. Podle typu imunochemické interakce se metody ELISA dělí na nekompetitivní a kompetitivní, které jsou dále rozlišovány dle imobilizovaného imunoreaktantu (protilátka nebo antigen). Metody s ukotvenou protilátkou

jsou využívány ke stanovení antigenu ve vzorku, naopak metody s ukotveným antigenem lze použít při stanovení protilátek [75,76].

Jedna z prací, zabývajících se tvorbou protilátek ke stanovení amanitinů metodou kompetitivní ELISA, byla publikována C. S. Bever a kol. roku 2018 a představila nové protilátky využitelné při analýze  $\alpha$ - i  $\beta$ -amanitinu. Amanitin není kvůli nízké molekulové hmotnosti imunogenní, tj. nevyvolává imunitní odpověď za tvorby protilátek. Pro analýzu potřebných imunogenních vlastností dosahuje až po jeho konjugaci s většími nosnými molekulami, nejčastěji s proteiny. Vazba toxinů na nosné proteiny byla prováděna pomocí různých metod a vzniklé konjugáty byly následně hodnoceny pro jejich účinnost generování protilátek a použitelnost při ELISA. Získaný postup pro konjugaci, využívající oxidaci jodistanem a redukční aminaci za vzniku stabilní aminové vazby mezi amanitinem a proteinem, umožnil provedení poměrně citlivých i selektivních imunoanalýz (limit detekce byl 1,0 mg/ml). Prezentovaná metoda navíc používá jednoduchou a rychlou přípravu vzorku, což je podstatné například při rychlých přenosných analýzách v terénu [77].

Další publikace C. S. Bever a kol. z roku 2020 se zabývá rychlou detekcí amatoxinů v moči [78]. Metoda využívá imunodetekci v laterálním toku na membráně (LFIA, z angličtiny lateral flow immunoassay), která je stejně jako ELISA založena na interakci imunoreaktantů, přičemž jedna z reagujících látek je zakotvena na membráně a druhá je barevně značena. Interakce protilátky s analytem probíhá při průtoku stanovované směsi obsahující interagující látku membránou a vznikající imunokomplex lze poté vizuálně detekovat [79]. LFIA umožňuje snížení detekčního limitu na 10 ng/ml pro  $\alpha$ - a  $\gamma$ -amanitin a 100 ng/ml pro  $\beta$ -amanitin. Zkoumanou moč je možné přímo analyzovat bez nutnosti jakékoliv úpravy, analýza trvá přibližně 10 min a výsledky jsou zjistitelné pouhým okem, bez potřeby speciálního vybavení, což je hlavní výhoda oproti ELISA i LC/MS metodám. Výsledky provedených analýz dobře korelovaly s výsledky získanými pomocí LC/MS, ačkoliv v případě velmi nízkých koncentrací toxinu poskytuje přesnější a spolehlivější výsledky LC/MS [78].

Poslední diskutovanou prací, zabývajících se bioanalytickými metodami stanovení amatoxinů, je publikace J. Gao a kol. z roku 2021, jež využívá ELISA s využitím magnetických kuliček (MELISA) za účelem zvýšení citlivosti, rychlosti a efektivity analýzy. Magnetické kuličky jsou tvořeny kompozitními materiály obsahujícími malé kovové částice, které mají superparamagnetické vlastnosti. V přítomnosti magnetického pole dochází k interakci kuliček s magnetickým polem a k jejich oddělení od roztoku, ve kterém byly přítomny. Po vymizení magnetického pole se kuličky vrací do rozptýleného stavu v roztoku. Představovaná metoda dále jako první využívá aptamery  $\alpha$ -amanitinu jako náhradu

protilátek. Aptamery jsou krátké, jednovláknové oligonukleotidy, které se specificky váží na cílové molekuly, čímž konkurují monoklonálním protilátkám a jsou proto známy rovněž jako chemické protilátky. Oproti protilátkám mají několik výhod, mají například nižší molekulární hmotnost, vysokou stabilitu, snadnější modifikovatelnost a v neposlední řadě postrádají imunogenicitu. Z toho důvodu jsou aptamery zkoumány pro jejich využití v bioanalýze. Použitý aptamer  $\alpha$ -amanitinu byl imobilizován na výše popsaných magnetických kuličkách. Výzkumné skupině se pomocí metody MELISA podařilo dosáhnout detekčního limitu  $0,372 \mu\text{g/ml}$  pro  $\alpha$ -amanitin v houbách a detekčního limitu  $0,337 \mu\text{g/ml}$  pro  $\alpha$ -amanitin v moči. Výsledky provedených analýz korespondovaly s hodnotami stanovenými pomocí HPLC. Vzhledem ke strukturní podobnosti  $\alpha$ - a  $\beta$ -amanitinu se jednotlivé deriváty touto metodou nepodařilo odlišit a spolehlivé rozlišení těchto analytů se nabízí jako předmět dalšího studia. Hlavní výhodou představované metody je lepší dostupnost aptamerů ve srovnání s monoklonálními protilátkami [80].

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Použité experimentální vybavení

Rozpouštědla a chemikálie byly zakoupeny od Sigma-Aldrich/Merck KGaA (Praha, Česká republika, [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)), Honeywell (Praha, Česká republika, [www.honeywell.com](http://www.honeywell.com)), MIKROCHEM (Pezinok, Slovenská republika, [www.mikrochem.com](http://www.mikrochem.com)) a Penta Chemicals (Praha, Česká republika, [www.pentachemicals.eu](http://www.pentachemicals.eu)). Veškeré analýzy byly provedeny pomocí hmotnostního spektrometru LTQ XL (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). Separace byly provedeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na sestavě Ultimate 3000 (Thermo Scientific) na kolonách Acclaim RSLC 120 C18 (100 mm × 2,1 mm, 2,2 μm) (Thermo Scientific) a Kinetex XB-C18 (50 mm × 2,1 mm, 2,6 μm) (Phenomenex, Torrance, Kalifornie, USA, [www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com)). Vzorky byly rozpuštěny v HPLC vodě, CH<sub>3</sub>CN a methanolu.

### 4.2. Pracovní postup

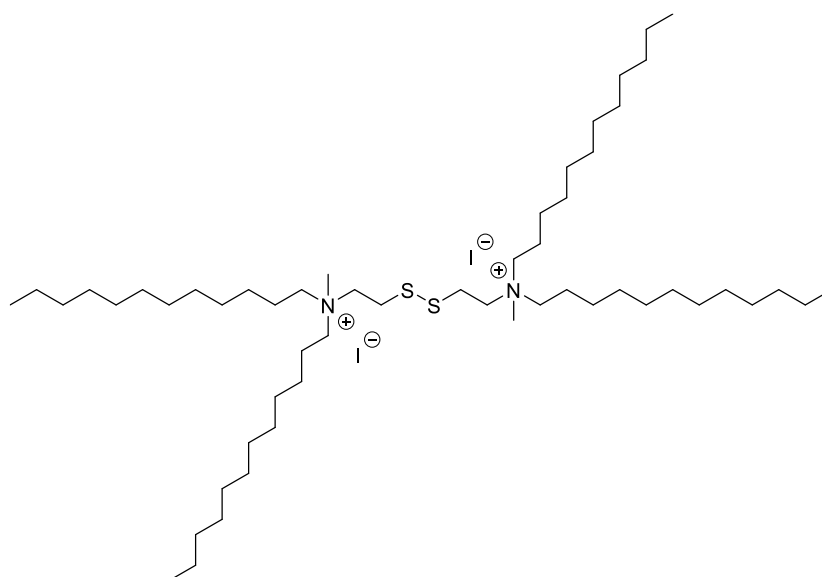
#### 4.2.1. *N*-Alkylace

**Obecný postup pro *N*-alkylaci cystaminu:** K roztoku cystaminu (1 ekv.) a báze (NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nebo NaOH (5-19 ekv.)) v bezvodém rozpouštědle (DMSO, ethanol, acetonitril), které bylo připraveno vysušením pomocí molekulárních sít 4 Å, bylo přidáno alkylační činidlo (methyl jodid, dodecyl jodid, butyl bromid nebo butyl jodid (4-28 ekv.)). Směs byla zahřívána v olejové lázni při 30-55 °C po dobu 24-144 hodin.

**Obecný postup pro analýzu:** Pokud reakční směs obsahovala pevnou fázi, byla odstředěna. Supernatant byl 100x zředěn v methanolu a poté znovu 100x ve směsi methanol:voda v poměru 1:1 (V/V). Připravený vzorek byl měřen metodou FIA/MS s nosnou kapalinou o složení – 0,1% roztok kyseliny mravenčí v 70% acetonitrilu a průtoku 0,1 ml/min.

**Příprava *N,N*-(disulfandiylbis(ethan-2,1-diyl))bis(*N*-dodecyl-*N*-methyl-dodekan-1-aminium jodidu (Obr. 8):** K roztoku cystaminu (1 g; 6,58 mmol; 1 ekv.) a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 g; 18,87 mmol; 2,8 ekv.) ve 20 ml bezvodého DMSO, byl přidán dodecyl jodid (10 ml; 40,51 mmol; 6,2 ekv.). Směs byla zahřívána v olejové lázni při 30 °C po dobu 72 hodin. Následně byl ke směsi přidán methyl jodid (3 ml; 48,19 mmol; 7,3 ekv.) a byla opět zahřívána v olejové lázni při 30 °C po dobu 72 hodin. Vzniklá pevná fáze byla odfiltrována a promyta vodou. Produkt z filtrátu byl extrahován do *n*-hexanu (3x5 ml). Extrakty byly spojeny a rozpouštědlo odfoukáno pod dusíkem. Produkt nebyl přečištěn a byl získán pouze jako hlavní složka směsi kvarterních amoniových solí s různým poměrem dodecylových a methylových skupin.



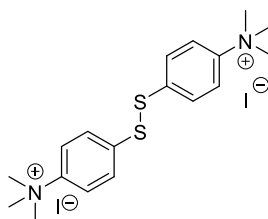


Obrázek 8: Struktura *N,N*-(disulfandiylbis(ethan-2,1-diyl))bis(*N*-dodecyl-*N*-methyldodekan-1-aminium) jodidu

**Obecný postup pro *N*-alkylaci 4-aminofenyl disulfidu:** K roztoku 4-aminofenyl disulfidu (1 ekv.) a  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2-9 ekv.) v bezvodém rozpouštědle (DMSO nebo acetonitril), které bylo připraveno vysušením pomocí molekulárních sít 4 Å, bylo přidáno alkylační činidlo (methyl jodid nebo dodecyl jodid (4-32 ekv.)). Směs byla zahřívána v olejové lázni při 22-80 °C po dobu 24-192 hodin.

**Obecný postup pro analýzu:** Pokud reakční směs obsahovala pevnou fázi, byla odstředěna. Supernatant byl 100x zředěn v methanolu a poté znovu 100x ve směsi methanol:voda v poměru 1:1 (V/V). Připravený vzorek byl měřen metodou FIA/MS s nosnou kapalinou o složení – 0,1% roztok kyseliny mravenčí v 2% vodném roztoku acetonitrilu (A) a 0,1% roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu (B) v poměru A:B 1:1 a průtoku 0,1 ml/min.

**Příprava 4,4-disulfandiylbis(*N,N,N*-trimethylbenzenaminium) jodidu (Obr. 9):** K roztoku 4-aminofenyl disulfidu (0,5 g; 2,01 mmol; 1 ekv.) a  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1 g; 9,44 mmol; 4,7 ekv.) ve 30 ml bezvodého acetonitrilu byl přidán methyl jodid (0,5 ml; 8,03 mmol; 4 ekv.). Směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 96 hodin. Následně byl ke směsi přidán methyl jodid (3 ml; 48,19 mmol; 24 ekv.) a byla opět míchána při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Vzniklá pevná fáze byla odfiltrována. Produkt nebyl přečištěn a byl získán pouze jako hlavní složka směsi methylovaného 4-aminofenyl disulfidu (5x a 6x methylovaného).



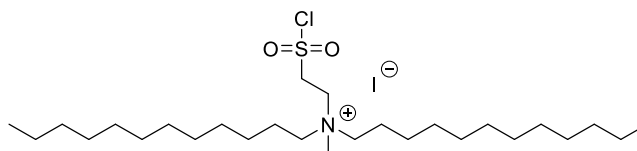
Obrázek 9: Struktura 4,4-disulfandiylbis(*N,N,N*-trimethylbenzenaminium) jodidu

#### 4.2.2. Oxidace

**Obecný postup pro oxidaci *N,N*-(disulfandiylbis(ethan-2,1-diyl))bis(*N*-dodecyl-*N*-methyl-dodekan-1-aminium jodidu):** K roztoku *N,N*-(disulfandiylbis(ethan-2,1-diyl))bis(*N*-dodecyl-*N*-methyl-dodekan-1-aminium jodidu) (1 ekv.) v rozpouštědle (acetonitril nebo dichlormethan) bylo přidáno oxidační činidlo ( $ZrCl_4$  s  $H_2O_2$ ,  $TMSCl$  s  $NH_4NO_3$ , nebo  $NCS$  (*N*-chlorsukcinimid, 1-10 ekv.)). Směs byla míchána v olejové nebo v ledové lázni při teplotě 0-50 °C po dobu 2-30 minut.

**Obecný postup pro analýzu:** Pokud reakční směs obsahovala pevnou fázi, byla odstředěna. Supernatant byl 100x zředěn v acetonitrilu a poté znovu 100x ve směsi acetonitril:voda v poměru 1:1 (V/V). Připravený vzorek byl měřen metodou FIA/MS s nosnou kapalinou o složení – 0,1% roztok kyseliny mravenčí v 70% acetonitrilu a průtoku 0,1 ml/min.

**Příprava *N*-(2-(chlorosulfonyl)ethyl)-*N*-dodecyl-*N*-methyl-dodekan-1-aminium jodidu (Obr. 10):** *N,N*-(disulfandiylbis(ethan-2,1-diyl))bis(*N*-dodecyl-*N*-methyl-dodekan-1-aminium jodid) (3,4 g; 4,00 mmol; 1 ekv.) byl rozpuštěn při teplotě <10 °C ve 2 ml acetonitrilu. K roztoku byl přidán  $NCS$  (2,14 g; 16 mmol; 4 ekv.) rozpuštěný v 6 ml směsi 2M-HCl:acetonitril 1:5. Směs byla míchána v ledové lázni při teplotě 3 °C po dobu 30 minut. Produkt nebyl přečištěn a byl získán jen ve směsi s didodecylmethylaminem.

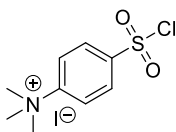


Obrázek 10: Struktura *N*-(2-(chlorosulfonyl)ethyl)-*N*-dodecyl-*N*-methyl-dodekan-1-aminium jodidu

**Obecný postup pro oxidaci 4,4-disulfandiylbis(*N,N,N*-trimethylbenzenaminium) jodidu:** K roztoku 4,4-disulfandiylbis(*N,N,N*-trimethylbenzenaminium) jodidu (1 ekv.) v acetonitrilu bylo přidáno NCS (4 ekv.). Směs byla míchána v ledové lázni při teplotě 0-10 °C po dobu 20-30 minut.

**Obecný postup pro analýzu:** Pokud reakční směs obsahovala pevnou fázi, byla odstředěna. Supernatant byl 100x zředěn v acetonitrilu a poté znovu 100x ve směsi acetonitril:voda v poměru 1:1 (V/V). Připravený vzorek byl měřen metodou FIA/MS s nosnou kapalinou o složení – 0,1% roztok kyseliny mravenčí v 70% acetonitrilu a průtoku 0,1 ml/min.

**Příprava 4-(chlorosulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu (Obr. 11):** 4,4-disulfandiylbis(*N,N,N*-trimethylbenzenaminium) jodid (0,175 g; 0,5 mmol; 1 ekv.) byl rozpuštěn při teplotě <10 °C v 1 ml acetonitrilu. K roztoku byl přidán NCS (0,26 g; 2 mmol; 4 ekv.) rozpuštěný v 1 ml směsi 2M-HCl:acetonitril 1:5. Směs byla míchána v ledové lázni při teplotě 2 °C po dobu 20 minut. Produkt nebyl přečištěn a byl získán jen ve směsi.



Obrázek 11: Struktura 4-(chlorosulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu

#### 4.2.3. Reakce dansylchloridu s $\beta$ -amanitinem

**Obecný postup pro reakci:** 1 mg  $\beta$ -amanitinu byl rozpuštěn v 10 ml methanolu a roztok byl rozdělen do deseti vialek.  $\beta$ -amanitin (20  $\mu$ l;  $2,17 \times 10^{-6}$  mmol; 1 ekv.) byl odfoukán pod proudem dusíku a odparek byl rozpuštěn v 0-20  $\mu$ l acetonitrilu. K roztoku byl přidán pufr ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  nebo  $\text{NaHCO}_3$  s  $\text{NaOH}$  (1-100  $\mu$ l)) a roztok dansylchloridu v acetonitrilu (20-200  $\mu$ l;  $7,4 \times 10^{-4}$ - $3,7 \times 10^{-3}$  mmol; 341-1705 ekv.). Reakční směs byla zahřívána na vodní lázni při 22-65 °C 3-15 minut.

**Obecný postup pro analýzu:** Reakční směs byla odstředěna a supernatant byl 2–100x zředěn ve vodě. Připravený vzorek byl měřen metodou HPLC/MS s mobilní fází o složení 2% acetonitril ve vodě s 0,1% kyselinou mravenčí (A) a acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí (B). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min s gradientovou elucí nastavenou následovně: 0-5,2 min 100-10 % A; 5,2-9 min 10 % A; 9-9,5 min 10-100 % A a 9,5-10,5 min 100 % A. Analýza trvala 10,5 min.

**Příprava dansylovaného  $\beta$ -amanitinu:**  $\beta$ -amanitin (20  $\mu$ l;  $2,17 \times 10^{-6}$  mmol; 1 ekv.) byl odfoukán pod proudem dusíku. K odparku byl přidán roztok dansylchloridu v acetonitrilu (20  $\mu$ l;  $7,4 \times 10^{-4}$  mmol; 341 ekv.) a uhličitanový pufr (1  $\mu$ l). Reakční směs byla zahřívána na vodní lázni při 50 °C 10 minut.

4.2.4. Reakce *N*-(2-(chlorosulfonyl)ethyl)-*N*-dodecyl-*N*-methyldodekan-1-aminium jodidu s  $\beta$ -amanitinem

**Obecný postup pro reakci:**  $\beta$ -amanitin (20  $\mu$ l;  $2,17 \times 10^{-6}$  mmol; 1 ekv.) byl odfoukán pod proudem dusíku a odparek byl rozpuštěn v 0-20  $\mu$ l acetonitrilu. K roztoku byl přidán pufr ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  nebo  $\text{NaHCO}_3$  s NaOH (1-100  $\mu$ l)) a reakční směs *N*-(2-(chlorosulfonyl)ethyl)-*N*-dodecyl-*N*-methyldodekan-1-aminium jodidu (20-200  $\mu$ l). Reakční směs byla zahřívána na vodní lázni při 22-65 °C 3-15 minut.

**Obecný postup pro analýzu:** Reakční směs byla odstředěna a supernatant byl 2–100x zředěn ve vodě. Připravený vzorek byl měřen metodou HPLC/MS s mobilní fází o složení 2% acetonitril ve vodě s 0,1% kyselinou mravenčí (A) a acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí (B). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min s gradientovou elucí nastavenou následovně: 0-5,2 min 100-10 % A; 5,2-9 min 10 % A; 9-9,5 min 10-100 % A a 9,5-10,5 min 100 % A. Analýza trvala 10,5 min.

4.2.5. Reakce 4-(chlorosulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu s  $\beta$ -amanitinem

**Obecný postup pro reakci:**  $\beta$ -amanitin (20  $\mu$ l;  $2,17 \times 10^{-6}$  mmol; 1 ekv.) byl odfoukán pod proudem dusíku a odparek byl rozpuštěn v 0-20  $\mu$ l acetonitrilu. K roztoku byl přidán pufr ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  nebo  $\text{NaHCO}_3$  s NaOH (1-100  $\mu$ l)) a reakční směs 4-(chlorosulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu (20-200  $\mu$ l). Reakční směs byla zahřívána na vodní lázni při 22-65 °C 3-15 minut.

**Obecný postup pro analýzu:** Reakční směs byla odstředěna a supernatant byl 2–100x zředěn ve vodě. Připravený vzorek byl měřen metodou HPLC/MS s mobilní fází o složení 2% acetonitril ve vodě s 0,1% kyselinou mravenčí (A) a acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí (B). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min s gradientovou elucí nastavenou následovně: 0-5,2 min 100-10 % A; 5,2-9 min 10 % A; 9-9,5 min 10-100 % A a 9,5-10,5 min 100 % A. Analýza trvala 10,5 min.

4.2.6. Reakce 4-(chlorosulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu s látkami s fenolickou skupinou

**Obecný postup pro reakci:** Byly připraveny roztoky vanilinu a kyseliny salicylové v acetonitrilu o koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Z roztoků bylo odebráno 10  $\mu$ l a rozpouštědlo bylo

odfoukáno pod dusíkem. K odparku bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  reakční směsi 4-(chlorosulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu a 1  $\mu\text{l}$  uhličitanového pufru. Reakční směsi byly zahřívány na vodní lázni při 50 °C 5-10 minut.

**Obecný postup pro analýzu:** Reakční směs byla odstředěna a supernatant byl 50x zředěn ve vodě. Připravený vzorek byl měřen metodou HPLC/MS s mobilní fází o složení 2% acetonitril ve vodě s 0,1% kyselinou mravenčí (A) a acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí (B). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min s gradientovou elucí nastavenou následovně: 0-5,2 min 100-10 % A; 5,2-9 min 10 % A; 9-9,5 min 10-100 % A a 9,5-10,5 min 100 % A. Analýza trvala 10,5 min.

### 4.3. Parametry HPLC/MS metod

Následující tabulky shrnují nastavené parametry HPLC/MS metod používané při analýzách  $\beta$ -amanitinu (Tab. IV a V), kyseliny salicylové (Tab. VI a VII) a vanilinu (Tab. VIII a IX).

*Tabulka IV:* Parametry průtoku a složení mobilních fází při analýze  $\beta$ -amanitinu, A – acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí, B – voda s 1% kyselinou mravenčí

Krok	Čas [min]	Průtok mobilní fáze [ml/min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
1	0,0	0,5	2,0	98,0
2	5,2		90,0	10,0
3	9,0		90,0	10,0
4	9,5		2,0	98,0
5	10,5		2,0	98,0

*Tabulka V:* Parametry měření MS spekter  $\beta$ -amanitinu

Teplota kapiláry [°C]	275,00
Napětí na kapiláře [V]	36,00
„Tube lens“ [V]	155,00
Průtok zamlžujícího plynu [arb]	27,00
Průtok pomocného plynu [arb]	0,00
Průtok „sweep gas“ [arb]	2,00

Tabulka VI: Parametry průtoku a složení mobilních fází při analýze kyseliny salicylové, A – 2% acetonitril ve vodě s 0,1% kyselinou mravenčí, B – acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí

Krok	Čas [min]	Průtok mobilní fáze [ml/min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
1	0,0	0,5	100,0	0,0
2	5,2		10,0	90,0
3	9,0		10,0	90,0
4	9,5		100,0	0,0
5	10,5		100,0	0,0

Tabulka VII: Parametry měření MS spekter kyseliny salicylové

Teplota kapiláry [°C]	280,00
Napětí na kapiláře [V]	-4,00
„Tube lens“ [V]	-42,32
Průtok zaměřujícího plynu [arb]	23,00
Průtok pomocného plynu [arb]	8,00
Průtok „sweep gas“ [arb]	2,00

Tabulka VIII: Parametry průtoku a složení mobilních fází při analýze vanilinu, A – 2% acetonitril ve vodě s 0,1% kyselinou mravenčí, B – acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí

Krok	Čas [min]	Průtok mobilní fáze [ml/min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
1	0,0	0,5	100,0	0,0
2	5,2		10,0	90,0
3	9,0		10,0	90,0
4	9,5		100,0	0,0
5	10,5		100,0	0,0

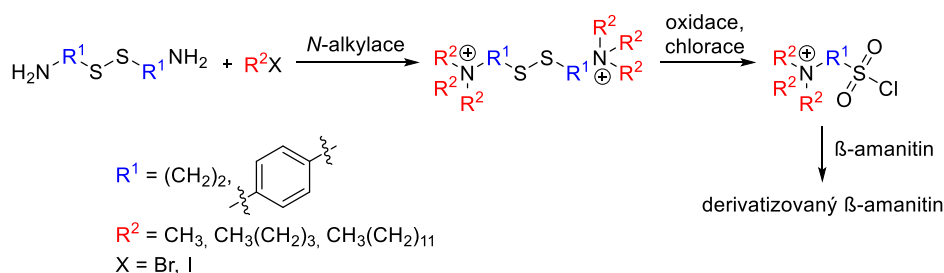
Tabulka IX: Parametry měření MS spekter vanilinu

Teplota kapiláry [°C]	280,00
Napětí na kapiláře [V]	-1,00
„Tube lens“ [V]	-37,32
Průtok zaměřujícího plynu [arb]	76,00
Průtok pomocného plynu [arb]	0,00
Průtok „sweep gas“ [arb]	15,00

## 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1. Příprava derivatizačního činidla

Příprava derivatizačního činidla spočívala v dvoukrokové syntéze vycházející z cystaminu nebo 4-aminofenyl disulfidu a alkyl halogenidu (Schéma IV). Reakcí vzniklá kvarterní amoniová sůl byla následně oxidována za rozštěpení vazby mezi atomy síry a vzniku chloresulfonylové skupiny. Vzniklé produkty byly použity k derivatizaci látek s fenolickou funkční skupinou, např.  $\beta$ -amanitinu, za účelem zvýšení jejich signálu při HPLC/MS analýze.



*Schéma IV:* Obecné schéma syntézy derivatizačního činidla a následné derivatizace  $\beta$ -amanitinu

Prvním krokem byla alkylace cystaminu dodecyl jodidem (Schéma V), která byla provedena podle podmínek nalezených v literatuře [81]. Bohužel reakce neprobíhala podle očekávání, pomocí HPLC/MS analýz bylo zjištěno, že dochází ke vzniku pouze malého množství cílového produktu a ve směsi převažuje terciární amin. Z tohoto důvodu byly postupně prováděny optimalizace reakce, které jsou shrnuty v tabulce X. Zkoumáno bylo použití různých typů a množství alkylačních činidel, bezvodých rozpouštědel i bazí. Vzhledem k velikosti řetězce dodecylu je možné sterické bránění vzniku kvarterní amoniové soli a z toho důvodu byly použity kratší molekuly (butyl a methyl). Použití těchto alkylačních činidel bylo vyzkoušeno jak samotných (butyl, methyl) tak i v kombinaci s dodecyl jodidem (methyl). Reakce byly testovány v rozsahu reakčních teplot 30-55 °C a v časovém rozmezí 24-144 hodin. Bylo pozorováno, že během reakce vznikaly dvě kapalné fáze a proto bylo testováno použití povrchově aktivních látek, které by usnadnily přechod reaktantů mezi fázemi. Vyzkoušené surfaktanty byly dodecylsírán sodný, tetrabutylamonium hexafluorofosfát a butyltrimethylamonium bis(trifluormethylsulfonyl)imid.



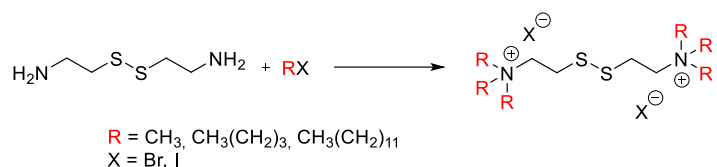


Schéma V: Alkylace cystaminu – činidla a podmínky: reakce 19 (Tab. X).

Tabulka X: Podmínky optimalizačních reakcí alkylace cystaminu. Použité zkratky: Dod dodecyl, Me methyl, Bu butyl. <sup>a</sup>Reakce s dodecylsíránem sodným; <sup>b</sup>Reakce s tetrabutylamoniem hexafluorofosfátem; <sup>c</sup>Reakce s butyltrimethylamoniem bis(trifluoromethylsulfonyl)imidem.

Č. reakce	Báze	Počet ekv. báze	Bezvodé rozp.	Objem rozp. (ml)	Alkylační činidlo	Množství alkyl. čin. (ekv.)	Teplota (°C)	Čas (h)	Vznik kvarterní soli	
1	NaHCO <sub>3</sub>	6,3	DMSO	5	Dodl	12,3	35	48	-	
2							45	48	ano	
3							55	48	ano	
4						24,6	55	120	ano	
						6,1	40	24	-	
5					Dodl, Mel	6,1 (Dodl); 3,9 (Mel)	40	72	ano	
6	BuBr	14,1		40	24	-				
7	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5		DMSO	5	BuBr	14,1	40	45	-
8 <sup>a</sup>								40	69	-
9 <sup>a</sup>							28,2	40	24	-
10								55	24	-
11 <sup>b</sup>								55	24	-
12 <sup>c</sup>							14,1	45	24	-
13 <sup>b</sup>								45	72	-
14			Dodl					6,1	45	96
15			BuBr				42,3	30	72	-
16			7,1				5	DMSO	5	Dodl, Mel
17	3	Mel		4	40	72				
18	EtONa	6	EtOH	5	Mel	24,3	40	72	-	
19	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	7,1	DMSO	4	Dodl, Mel	6,1 (Dodl); 7,3 (Mel)	30	96	ano	
20			CH <sub>3</sub> CN	2			9,2 (Dodl); 24,3 (Mel)	30	96	ano
21	NaOH	18,9	EtOH	5	Mel	7,3	30	72	-	

Při snaze o získání čistého produktu z reakční směsi se vyskytly problémy s rozpustností produktů i rozdělením různě alkylovaných molekul cystaminu od sebe. Bylo vyzkoušeno vysrážení produktu ethylacetátem podle původního postupu [81], extrakce do hexanu a přečištění reakční směsi pomocí kationtového iontoměniče.

Ačkoliv k produktu vedlo více testovaných postupů, k syntéze ve větším měřítku byly vybrány podmínky reakce číslo 19 (Tab. XI). Jako báze byl použitý  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , reakce probíhala v bezvodém DMSO po dobu 72 hodin s dodecyl jodidem a dalších 72 hodin po přidání methyl jodidu. Výsledkem byla směs kvarterních amoniových solí ve formě nažloutlé pevné látky s různým poměrem dodecylových a methylových skupin, které od sebe nebylo možné dále oddělit a pro další reakci byla proto použita vodou promytá surová směs. Produkt při analýze poskytoval ion  $\text{M}^{2+}$  s poměrem  $m/z$  427,58 (Příloha 1).

Druhým krokem byla oxidace vazby mezi atomy síry (Schéma VI). Byla vyzkoušena reakce s  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{ZrCl}_4$  podle podmínek z literatury [82], ale tato reakce i přes optimalizace shrnuté v tabulce XI neposkytovala cílový *N*-(2-(chlorosulfonyl)ethyl)-*N*-dodecyl-*N*-methyl-dodekan-1-aminium jodid ani v malém množství. Proto byly vyzkoušeny další postupy – oxidace pomocí TMSCl (trimethylsilylchloridu) [83] a NCS (*N*-chlorsukcinimidu) [84]. Reakce s TMSCl byla vyzkoušena jen jednou a taktéž neposkytovala cílový produkt. Naopak reakce s NCS k produktu vedla, ale opět muselo být přistoupeno k řadě optimalizačních reakcí s různým objemem rozpouštědla a množství NCS. Reakční směs 6 (Tab. XI) obsahovala produkt a *N*-dodecyl-*N*-methyl-1-dodekanamin a nebyla dále zpracována k oddělení produktu, ale byla použita rovnou k derivatizačním reakcím. Produkt poskytoval ion  $\text{M}^+$  s poměrem  $m/z$  494,50 (Příloha 2). Bylo zjištěno, že se produkt s časem rozkládá a proto bylo činidlo připraveno těsně před každou derivatizací. Z tohoto důvodu bylo také zkoumáno použití 4-aminofenyl disulfidu místo cystaminu, u kterého by mohl být produkt po oxidaci stabilizovaný benzenovým jádrem.

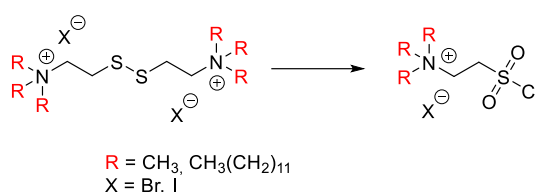


Schéma VI: Oxidace vazby mezi atomy síry – činidla a podmínky: reakce 6 (Tab. XI).

Tabulka XI: Podmínky optimalizačních reakcí oxidace směsi po alkylationi cystaminu. <sup>a</sup>*N*-(2-(chlorosulfonyl)ethyl)-*N*-dodecyl-*N*-methyldodekan-1-aminium jodid.

Č. reakce	Rozp.	Objem rozp. (ml)	Oxidační činidlo	Množství ox. čin. (ekv.)	Další látka v reakci	Množství ost. látek (ekv.)	Teplota (°C)	Čas (min)	Produkt <sup>a</sup>
1	CH <sub>3</sub> CN	3,2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6,2	ZrCl <sub>4</sub>	1	22	2	-
2		10		9,5			0	35	-
3		0,25	NCS	4	-	-	0	10	ano
4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5	TMSCI	5	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5	50	30	-
5	CH <sub>3</sub> CN	0,5	NCS	4	-	-	0	30	ano
6		0,25					0	30	ano
7		0,35					1	30	ano
8		0,4					1	30	ano
9		0,6					1	30	ano
10		1					1	30	ano
11				8			5	30	ano

Následně byla provedena alkylationi 4-aminofenyl disulfidu pomocí methyl jodidu a dodecyl jodidu (Schéma VII). Nejprve byla vyzkoušena alkylationi dodecyl jodidem podle podmínek z literatury [81]. Podmínky této reakce shrnuje tabulka XII. Opět byly vyzkoušeny různé reakční časy, teploty, množství i typ alkylationi činidla. U všech těchto reakcí byl pozorován vznik směsi látek, z nichž pouze některé odpovídaly různému stupni alkylationi 4-aminofenyl disulfidu a další nebyly vůbec identifikovány. Dále byla vyzkoušena alkylationi methyl jodidem podle podmínek z literatury [85] s následným přidavkem alkylationi činidla. Při této reakci docházelo ke vzniku cílového 4,4-disulfandiylbis(*N,N,N*-trimethylbenzenaminium) jodidu jako pevné nažloutlé látky. Produkt nebyl přečištěn a byl získán ve směsi s 5x methylovaným 4-aminofenyl disulfidem (Příloha 3).

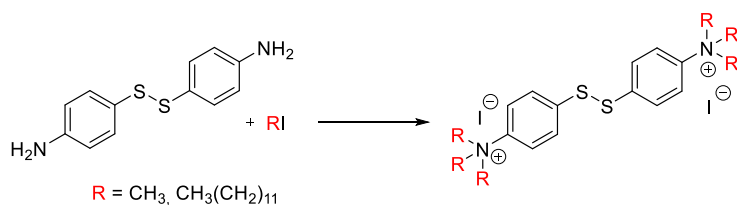


Schéma VII: Alkylationi 4-aminofenyl disulfidu – činidla a podmínky: reakce 4 (Tab. XII).

Tabulka XII: Podmínky optimalizačních reakcí alkylace 4-aminofenyl disulfidu. Použité zkratky: Dod dodecyl, Me methyl.

Č. reakce	Báze	Počet ekv. báze	Bezvodé rozp.	Objem rozp. (ml)	Alkylační činidlo	Množství alkyl. čin. (ekv.)	Teplota (°C)	Čas (h)	Vznik kvarterní soli
1	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	7,1	DMSO	6	Dodl	12	40	192	-
2		9,4		10	Dodl+ Mel	12 (Dodl); 31,8 (Mel)	60	96	-
3					Dodl	12	80	30	-
4		4,7	CH <sub>3</sub> CN	30	Mel	4	22	96	ano
					+ Mel	23,8	22	24	ano
					+ Dodl	12	22	24	ano

V dalším kroku byla provedena oxidace 4-disulfandiylbis(*N,N,N*-trimethyl-benzenaminium) jodidu podle podmínek z literatury [84] (Schéma VIII). Reakční podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.2.2. Cílový 4,4-disulfandiylbis(*N,N,N*-trimethylbenzenaminium) jodid nebyl ze směsi izolován a k derivatizačním reakcím byla použita reakční směs. Produkt poskytoval ion M<sup>+</sup> s m/z 234,17 (Příloha 4). Byla pozorována větší stabilita než u produktu po oxidaci alkylovaného cystaminu.

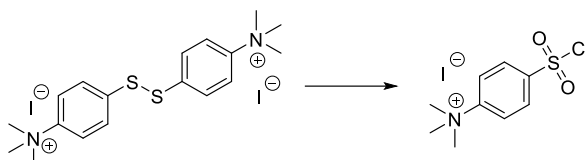


Schéma VIII: Oxidace 4-disulfandiylbis(*N,N,N*-trimethyl-benzenaminium) jodidu – činidla a podmínky: NCS, 2M-HCl:CH<sub>3</sub>CN 1:5, 2 °C, 20 min. Produkt nebyl přečištěn a byl získán jen ve směsi.

## 5.2. Derivatizační reakce

Produkty vzniklé oxidačními reakcemi byly spolu s dansylchloridem použity jako derivatizační činidla při reakcích s  $\beta$ -amanitinem, vanilinem a kyselinou salicylovou za účelem zvýšení signálu při HPLC/MS analýze těchto látek. Reakce dansylchloridu s  $\beta$ -amanitinem, provedeny za účelem porovnání výsledků reakcí toxinu s nově připravenými činidly, poskytovaly dansylovaný  $\beta$ -amanitin po řadě optimalizačních kroků. Byly testovány různé objemy acetonitrilu jako rozpouštědla, množství a druhy pufrů, množství dansylchloridu i reakční teploty a časy. Tyto optimalizace shrnuje tabulka XIII

a jsou inspirovány předcházející diplomovou prací [5]. Dansylace  $\beta$ -amanitinu nezajistila ani v jednom případě zvýšení signálu při analýze. Dansylovaný  $\beta$ -amanitin poskytoval ion  $M+H^+$  s poměrem  $m/z$  1153,58 v retenčním čase 4,35 min (Příloha 5 a 6).

*Tabulka XIII:* Testované podmínky reakce  $\beta$ -amanitinu s dansylchloridem. <sup>a</sup>Dansylovaný  $\beta$ -amanitin.

Č. reakce	Prostředí reakce	Objem pufru ( $\mu$ l)	Množství derivatizačního činidla ( $\mu$ l)	Teplota ( $^{\circ}$ C)	Čas (min)	Produkt <sup>a</sup>
1	0,1M uhlič. pufr	100	100	22	30	-
2		100	200	35	5	-
3		100	100	50	5	-
4		100	200	50	5	-
5	1M uhlič. pufr	1	20	50	10	ano

*N*-(2-(chlorsulfonyl)ethyl)-*N*-dodecyl-*N*-methyl-dodekan-1-aminium jodid ani 4-(chlorsulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodid neposkytovaly při reakci s  $\beta$ -amanitinem derivatizovaný toxin. Byly testovány různé podmínky pro reakci, které jsou shrnuty v tabulkách XIV a XV. Bylo zjištěno, že při zahřívání v alkalickém prostředí pufru se  $\beta$ -amanitin rozkládá, což je zřejmě důvod neproběhnutí derivatizační reakce.

*Tabulka XIV:* Testované podmínky reakce  $\beta$ -amanitinu s *N*-(2-(chlorsulfonyl)ethyl)-*N*-dodecyl-*N*-methyl-dodekan-1-aminium jodidem. <sup>a</sup>Derivatizovaný  $\beta$ -amanitin.

Č. reakce	Prostředí reakce	Objem pufru ( $\mu$ l)	Množství přidané směsi ( $\mu$ l)	Teplota ( $^{\circ}$ C)	Čas (min)	Produkt <sup>a</sup>
1	0,1M uhlič. pufr	100	100	22	30	-
2			200	22	10	-
3			200	50	10	-
4			200	55	5	-
5		50	200	55	5	-

Tabulka XV: Testované podmínky reakce  $\beta$ -amanitinu s 4-(chlorsulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidem. <sup>a</sup>Derivatizovaný  $\beta$ -amanitin.

Č. reakce	Prostředí reakce	Objem pufru ( $\mu$ l)	Objem derivatizačního činidla ( $\mu$ l)	Teplota ( $^{\circ}$ C)	Čas (min)	Produkt <sup>a</sup>
1	0,1M uhlič. pufr	100	200	22	10	-
2				50	5	-
3				50	10	-
4				65	6	-
5				65	12	-
6	0,1M uhlič. pufr + 2M-NaOH	100 (pufr); 30 (NaOH)		65	10	-
7		100 (pufr); 50 (NaOH)		65	10	-
8		100 (pufr); 80 (NaOH)		65	10	-
9	-	-		100	5	-
10	1M uhlič. pufr	1		20	50	10

Dále bylo vyzkoušeno zvýšení signálu při HPLC/MS analýze vanilinu a kyseliny salicylové reakcí s 4-(chlorsulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidem. Reakce za podmínek uvedených v kapitole 4.2.6. produkovaly deriváty vanilinu a kyseliny salicylové. Derivatizovaný vanilin poskytoval ion  $M^+$  s  $m/z$  350,25 v retenčním čase 2,67 min (Přílohy 7 a 8). Derivatizovaná kyselina salicylová poskytovala ion  $M^+$  s  $m/z$  336,17 v retenčním čase 3,11 min (Přílohy 9 a 10). Parametry ionizace a iontové optiky byly laděny na vanilin a kyselinou salicylovou. Derivát vanilinu neposkytoval vyšší signál než nativní forma. Naopak kyselina salicylová poskytovala mnohonásobně vyšší signál. Tento experiment byl však proveden z časových důvodů jen jednou.

### 5.3. Ladění parametrů ionizace a iontové optiky

Nejprve byla optimalizována metoda pro analýzu  $\beta$ -amanitinu pomocí HPLC/MS. Použité parametry pro chromatografickou separaci jsou uvedeny v tabulce IV (Kapitola 4.3.) a parametry pro MS analýzu v pozitivním módu v tabulce V.  $\beta$ -Amanitin poskytoval ion  $M+H^+$  s poměrem  $m/z$  920,42 a  $M+Na^+$  s poměrem  $m/z$  942,50 v retenčním čase 2,81 min (Příloha 11 a 12).

Dále byla optimalizována metoda pro analýzu kyseliny salicylové v negativním módu analýzy HPLC/MS. Nastavené parametry pro HPLC s gradientovou elucí jsou uvedeny v tabulce VI. Parametry pro MS analýzu jsou uvedeny v tabulce VII. Kyselina salicylová poskytovala iont  $[M-H]^-$  s poměrem  $m/z$  137,00 v retenčním čase 3,86 min (Příloha 13 a 14). Chromatogramy obsahovaly píky dimeru a trimeru kyseliny mravenčí z mobilní fáze, který interferoval s  $m/z$  kyseliny salicylové. Tento problém byl vyřešen sledováním fragmentů kyseliny salicylové s  $m/z$  93,00 (Příloha 15). Retenční čas byl 2,96 min, jiný než předchozí způsobený výměnou chromatografické kolony za kratší.

Byla optimalizována i metoda pro analýzu vanilinu v negativním módu analýzy HPLC/MS. Nastavené parametry pro HPLC s gradientovou elucí jsou uvedeny v tabulce VIII. Parametry pro MS analýzu jsou uvedeny v tabulce IX. Vanilin poskytoval iont  $[M-H]^-$  s poměrem  $m/z$  150,92 v retenčním čase 2,46 min. Ve spektru byla opět kyselina mravenčí a její dimer jako hlavní píky (Příloha 16 a 17).

Z časových důvodů nebyla vytvořena metoda pro analýzu vanilinu derivatizovaného 4-(chlorosulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidem. Tato metoda by byla potřebná pro porovnání citlivosti analýzy nativního a derivatizovaného vanilinu.

## 6. ZÁVĚR

V rámci předkládané bakalářské práce byly zkoumány možnosti syntézy derivatizačního činidla připraveného *N*-alkylací cystaminu a 4-aminofenyl disulfidu a následnou oxidativní chlorsulfonací vzniklých kvarterních amoniových solí. Byla připravena dvě různá derivatizační činidla obsahující kvarterní dusík, který by měl umožnit zvýšení ionizačního výtěžku elektrosprejové ionizace, a sulfonylchloridovou skupinu zprostředkující reakci s fenolickými hydroxyskupinami.

Připravená činidla byla podrobena reakcím s  $\beta$ -amanitinem, které ale neprobíhaly za vzniku derivatizovaného amanitinu i přes testování řady různých podmínek. Bylo zjištěno, že se  $\beta$ -amanitin rozkládá v alkalickém prostředí za vyšších teplot, což znemožnilo derivatizaci a vyžaduje další testování podmínek pro reakci. Kvůli časové náročnosti alkylace cystaminu nedošlo k vytvoření metod a vylepšení podmínek pro reakci derivatizačních činidel s  $\beta$ -amanitinem. Zejména z tohoto důvodu nebyla porovnána změna citlivosti nativní a derivatizované formy.

K testování účinnosti připraveného činidla ve smyslu zvýšení ionizačního výtěžku byli jako náhradní zástupci látek s fenolickou skupinou zvoleni kyselina salicylová a vanilin, u kterých díky jednodušší struktuře nehrozí degradace v průběhu derivatizace. Byly vyzkoušeny reakce činidla s kyselinou salicylovou a vanilinem k prokázání zvýšení odezvy při MS analýze. Testované reakce vedly ke vzniku derivátů těchto látek a byl pozorován značný nárůst výtěžku ionizace u derivátu kyseliny salicylové. Ačkoli byla vytvořena HPLC/MS metoda i pro vanilin, nebylo prokázáno zvýšení citlivosti z důvodu nevytvoření metody pro derivatizovanou formu této látky.

Vyvinuté podmínky pro syntézu derivatizačních činidel a další poznatky získané v rámci prezentované práce lze použít při dalším výzkumu v této oblasti.



## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] T. Wieland, The toxic peptides from Amanita mushrooms., *Int. J. Pept. Protein Res.* 22 (1983) 257–276.
- [2] X. Yin, A.-A. Yang, J.-M. Gao, Mushroom Toxins: Chemistry and Toxicology, *J. Agric. Food Chem.* 67 (2019) 5053–5071.
- [3] A. Loranger, B. Tuchweber, C. Gicquaud, S. St-Pierre, M.G. Côté, Toxicity of peptides of Amanita virosa mushrooms in mice, *Fundam. Appl. Toxicol.* 5 (1985) 1144–1152.
- [4] J. Garcia, V.M. Costa, A. Carvalho, P. Baptista, P.G. de Pinho, M. de Lourdes Bastos, F. Carvalho, Amanita phalloides poisoning: Mechanisms of toxicity and treatment, *Food Chem. Toxicol.* 86 (2015) 41–55.
- [5] P. Rovňáková, Využití derivatizačních reakcí ke zvýšení ionizačního výtěžku amanitinů při ESI/MS analýze, diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, 2018.
- [6] R. Dorizzi, D. Michelot, F. Tagliaro, S. Ghielmi, Methods for chromatographic determination of amanitins and related toxins in biological samples, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 580 (1992) 279–291.
- [7] W.-S. Jo, M.A. Hossain, S.-C. Park, Toxicological profiles of poisonous, edible, and medicinal mushrooms, *Mycobiology.* 42 (2014) 215–220.
- [8] V. Hrdina, Přírodní toxiny a jedy, Galén, Praha, 2004.
- [9] G. Zanotti, G. Petersen, T. Wieland, Structure-toxicity relationships in the amatoxin series. Structural variations of side chain 3 and inhibition of RNA polymerase II., *Int. J. Pept. Protein Res.* 40 (1992) 551–558.
- [10] B.D. A., C. Patrick, K.R. D., Structural basis of transcription:  $\alpha$ -Amanitin–RNA polymerase II cocystal at 2.8 Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 1218–1222.
- [11] J. Mann, Jedy, drogy, léky, Academia, Praha, 1996.
- [12] M. Leite, A. Freitas, A.M. Azul, J. Barbosa, S. Costa, F. Ramos, 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 (2013) 77–87.

- [13] J. a M. Erhartovi, Houbařský atlas, Finidr, Āeský Těřín, 1965.
- [14] J. Vetter, Toxins of Amanita phalloides., *Toxicon*. 36 (1998) 13–24.
- [15] M.S. Bonnet, P.W. Basson, The toxicology of Amanita phalloides, *Homeopathy*. 91 (2002) 249–254.
- [16] E. Garnweidner, Houby - urĀování, poznávání, sbírání, Svojtka & Co., Praha, 1999.
- [17] S. Jirásek, *BioLib.cz*, (2002). <https://www.biolib.cz/cz/%0Ataxon/id60473/%0A>, stařeno 20. Āervna 2022.
- [18] J. Holec, A. Bielich, M. Beran, Přehled hub střední Evropy, *Academia*, Praha, 2012.
- [19] L. Hagara, V. Antonín, J. Baier, Velký atlas hub, *Ottovo nakladatelství*, Praha, 2006.
- [20] V. Antonín, *Encyklopedie hub a lišejníků*, *Nakladatelství Academia*, Praha, 2006.
- [21] T. Wieland, H. Faulstich, Fifty years of amanitin., *Experientia*. 47 (1991) 1186–1193.
- [22] T. Wieland, *Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms*, Springer Berlin, Heidelberg, 2022.
- [23] T. Zilker, H. Faulstich, Cyclopeptide-Containing Mushrooms: The Deadly Amanitas, in: 2016: pp. 1–20.
- [24] E. Munekata, H. Faulstich, T. Wieland, Resynthesis of Phalloidin and Phallisin from the Seco-Compounds, *Angew. Chemie Int. Ed. English*. 16 (1977) 267–268.
- [25] K. Matinkhoo, A. Pryyma, M. Todorovic, B.O. Patrick, D.M. Perrin, Synthesis of the Death-Cap Mushroom Toxin  $\alpha$ -Amanitin, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (2018) 6513–6517.
- [26] C. Lutz, W. Simon, S. Werner-Simon, A. Pahl, C. Müller, Total Synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Amanitin, *Angew. Chemie Int. Ed.* 59 (2020) 11390–11393.
- [27] G. Moldenhauer, A. V Salnikov, S. Lüttgau, I. Herr, J. Anderl, H. Faulstich, Therapeutic Potential of Amanitin-Conjugated Anti-Epithelial Cell Adhesion Molecule Monoclonal Antibody Against Pancreatic Carcinoma, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 104 (2012) 622–634.
- [28] V. Figueroa-Vazquez, J. Ko, C. Breunig, A. Baumann, N. Giesen, A. Pálfi, C. Müller, C. Lutz, T. Hechler, M. Kulke, C. Müller-Tidow, A. Krämer, H. Goldschmidt, A. Pahl, M.S. Raab, HDP-101, an Anti-BCMA Antibody–Drug Conjugate, Safely Delivers Amanitin to Induce Cell Death in Proliferating and Resting Multiple Myeloma Cells, *Mol. Cancer Ther.* 20 (2021) 367–378.

- [29] H.E. Hallen, H. Luo, J.S. Scott-Craig, J.D. Walton, Gene family encoding the major toxins of lethal *Amanita* mushrooms, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 19097–19101.
- [30] J. Magdalan, A. Ostrowska, A. Piotrowska, A. Gomułkiewicz, M. Podhorska-Okolów, D. Patrzalek, A. Szelaq, P. Dzięgiel, Benzylpenicillin, acetylcysteine and silibinin as antidotes in human hepatocytes intoxicated with  $\alpha$ -amanitin, *Exp. Toxicol. Pathol.* 62 (2010) 367–373.
- [31] A. Jaeger, F. Jehl, F. Flesch, P. Sauder, J. Kopferschmitt, Kinetics of amatoxins in human poisoning: therapeutic implications., *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 31 (1993) 63–80.
- [32] C. Busi, L. Fiume, D. Costantino, M. Borroni, G. Ambrosino, A. Olivotto, D. Bernardini, [The determination of amanitines in the serum of patients poisoned by *amanita phalloides* (author's transl)]., *Nouv. Presse Med.* 6 (1977) 2855–2857.
- [33] B. Le Daré, P.-J. Ferron, A. Couette, C. Ribault, I. Morel, T. Gicquel, In vivo and in vitro  $\alpha$ -amanitin metabolism studies using molecular networking, *Toxicol. Lett.* 346 (2021) 1–6.
- [34] J. Homann, P. Rawer, H. Bleyl, K.J. Matthes, D. Heinrich, Early detection of amatoxins in human mushroom poisoning., *Arch. Toxicol.* 59 (1986) 190–191.
- [35] H. Faulstich, A. Talas, H.H. Wellhöner, Toxicokinetics of labeled amatoxins in the dog., *Arch. Toxicol.* 56 (1985) 190–194.
- [36] H. Shahbaz, M. Gupta, Creatinine Clearance., in: *Treasure Island (FL)*, 2022.
- [37] C. Busi, L. Fiume, D. Costantino, M. Langer, F. Vesconi, *Amanita* toxins in gastroduodenal fluid of patients poisoned by the mushroom, *Amanita phalloides.*, *N. Engl. J. Med.* 300 (1979) 800.
- [38] K.J. Berger, D.A. Guss, Mycotoxins revisited: Part I., *J. Emerg. Med.* 28 (2005) 53–62.
- [39] R.J. Washabau, M.J. Day, *Canine and Feline Gastroenterology*, Saunders, 2012.
- [40] L. Lawton, S. Bhraonain, Accidental Poisoning by Death Cap Mushrooms: Be Careful What You Eat, *Wilderness Environ. Med.* 24 (2013).
- [41] T. Ferenc, B. Lukasiewicz, J. Ciećwierz, E. Kowalczyk, Poisonings with *Amanita phalloides*, *Med. Pr.* 60 (2009) 415–426.

- [42] C. Karlson-Stiber, H. Persson, Cytotoxic fungi--an overview., *Toxicon*. 42 (2003) 339–349.
- [43] K. Letschert, H. Faulstich, D. Keller, D. Keppler, Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes., *Toxicol. Sci.* 91 (2006) 140–149.
- [44] S. Ohtsuki, T. Takizawa, H. Takanaga, S. Hori, K. Hosoya, T. Terasaki, Localization of organic anion transporting polypeptide 3 (oatp3) in mouse brain parenchymal and capillary endothelial cells., *J. Neurochem.* 90 (2004) 743–749.
- [45] J. Koolman, K.-H. Röhm, *Barevný atlas biochemie*, Grada Publishing, a.s., Praha, 2012.
- [46] S. Gundala, L.D. Wells, M.T. Milliano, V. Talkad, B.A. Luxon, B.A. Neuschwander-Tetri, The hepatocellular bile acid transporter Ntcp facilitates uptake of the lethal mushroom toxin  $\alpha$ -amanitin, *Arch. Toxicol.* 78 (2004) 68–73.
- [47] C. Eller, L. Heydmann, C.C. Colpitts, E.R. Verrier, C. Schuster, T.F. Baumert, The functional role of sodium taurocholate cotransporting polypeptide NTCP in the life cycle of hepatitis B, C and D viruses., *Cell. Mol. Life Sci.* 75 (2018) 3895–3905.
- [48] M. Trauner, J.L. Boyer, Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation., *Physiol. Rev.* 83 (2003) 633–671.
- [49] V.T. Nguyen, F. Giannoni, M.-F. Dubois, S.-J. Seo, M. Vigneron, C. Kédinger, O. Bensaude, In Vivo Degradation of RNA Polymerase II Largest Subunit Triggered by  $\alpha$ -Amanitin, *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 2924–2929.
- [50] V. D, J.G. Voet, *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha, 1995.
- [51] M.D. Rudd, D.S. Luse, Amanitin greatly reduces the rate of transcription by RNA polymerase II ternary complexes but fails to inhibit some transcript cleavage modes., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 21549–21558.
- [52] Y. Arima, M. Nitta, S. Kuninaka, D. Zhang, T. Fujiwara, Y. Taya, M. Nakao, H. Saya, Transcriptional Blockade Induces p53-dependent Apoptosis Associated with Translocation of p53 to Mitochondria\*, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 19166–19176.
- [53] J. Magdalan, A. Piotrowska, A. Gomułkiewicz, T. Sozański, M. Podhorska-Okołów, A. Szelaąg, P. Dzięgiel, Benzylpenicyllin and acetylcysteine protection from  $\alpha$ -amanitin-induced apoptosis in human hepatocyte cultures, *Exp. Toxicol. Pathol.* 63 (2011) 311–315.

- [54] E. Kieslichova, Intoxikace muchomurkou zelenou: mechanismus toxicity, klinické projevy a terapeutické postupy, *Vnitr. Lek.* 67 (2021) E13–E17. <https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/artkey/vnl-202107-0012.php>, staženo 15. dubna 2022.
- [55] D. Pelclová, *Nejčastější otravy a jejich terapie*, Galén, Praha, 2009.
- [56] Y. Ye, Z. Liu, Management of *Amanita phalloides* poisoning: A literature review and update., *J. Crit. Care.* 46 (2018) 17–22.
- [57] F. Enjalbert, S. Rapior, J. Nouguier-Soulé, S. Guillon, N. Amouroux, C. Cabot, Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis., *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 40 (2002) 715–757.
- [58] V. Graff-Lonnevig, G. Hedlin, A. Lindfors, Penicillin allergy--a rare paediatric condition?, *Arch. Dis. Child.* 63 (1988) 1342–1346.
- [59] D. Andrade, K. Jojima, A. Lacerda, L. Machado, L. Ensina, I. Nunes, D. Solé, Beta-lactam hypersensitivity: not always what it seems, *World Allergy Organ. J.* 8 (2015) A168.
- [60] J. Šperl, J. Petrášek, Doporučený postup ČHS pro diagnostiku a léčbu intoxikace houbou „*Amanita phalloides*“, <https://www.ces-hep.cz/file/328/doporuceny-postup-chs-amanita-phalloides.pdf>, staženo 26. dubna 2022.
- [61] G.S. Kelly, Clinical applications of N-acetylcysteine., *Altern. Med. Rev.* 3 (1998) 114–127.
- [62] U. Mengs, R.-T. Pohl, T. Mitchell, Legalon® SIL: the antidote of choice in patients with acute hepatotoxicity from amatoxin poisoning., *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (2012) 1964–1970.
- [63] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 31553, Silibinin, (2022). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Silibinin>.
- [64] P. Trunečka, :Indikace k transplantaci jater:, <https://www.ces-hep.cz/file/329/doporuceny-postup-chs-indikace-k-transplantaci-jater.pdf>, staženo 3. května 2022.
- [65] A.C. Anand, P. Nightingale, J.M. Neuberger, Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure: an assessment of the King's criteria, *J. Hepatol.* 26 (1997) 62–68.

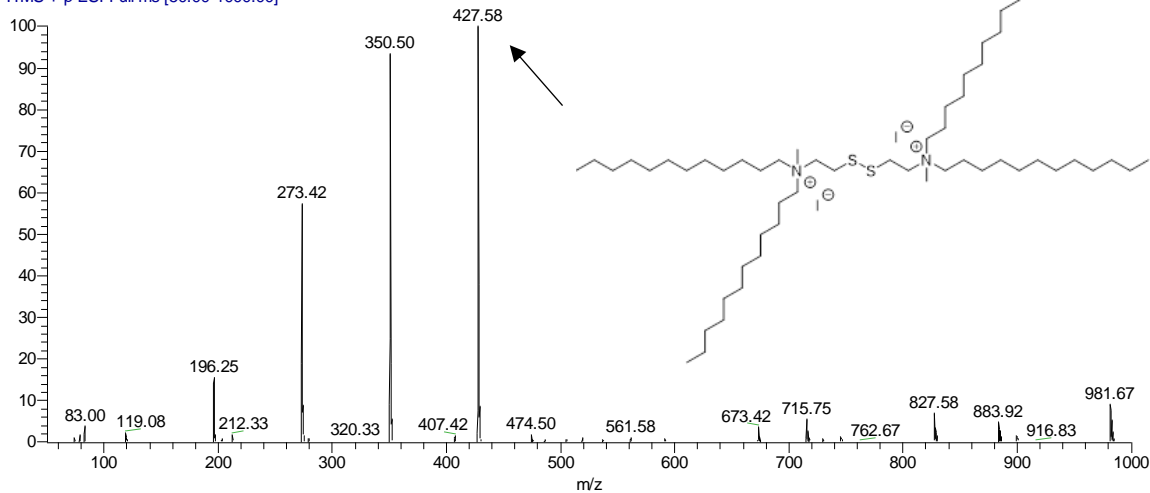
- [66] I. Garcia de la Fuente, V.A. McLin, P.C. Rimensberger, B.E. Wildhaber, Amanita Poisoning and Liver Transplantation: Do We Have the Right Decision Criteria?, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 53 (2011).
- [67] L. Escudié, C. Francoz, J.-P. Vinel, R. Moucari, M. Cournot, V. Paradis, A. Sauvanet, J. Belghiti, D. Valla, J. Bernuau, F. Durand, Amanita phalloides poisoning: reassessment of prognostic factors and indications for emergency liver transplantation., *J. Hepatol.* 46 (2007) 466–473.
- [68] W.E. Brandenburg, K.J. Ward, Mushroom poisoning epidemiology in the United States., *Mycologia.* 110 (2018) 637–641.
- [69] P. Klouda, *Moderní analytické metody*, Ostrava, 2003.
- [70] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Analytická chemie*, Praha, 2019.
- [71] Z. Mao, Y. Yu, H. Sun, Y. Cao, Q. Jiang, C. Chu, Y. Sun, S. Huang, J. Zhang, F. Chen, Development of a simple and reliable method for  $\alpha$ -amanitin detection in rat plasma and its application to a toxicokinetic study, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 35 (2021) e9184.
- [72] M.S. Filigenzi, R.H. Poppenga, A.K. Tiwary, B. Puschner, Determination of  $\alpha$ -Amanitin in Serum and Liver by Multistage Linear Ion Trap Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 2784–2790.
- [73] T.P. Bambauer, L. Wagmann, A.A. Weber, M.R. Meyer, Analysis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amanitin in Human Plasma at Subnanogram per Milliliter Levels by Reversed Phase Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Orbitrap Mass Spectrometry, *Toxins* . 12 (2020).
- [74] X.-M. Xu, Z. Meng, J.-S. Zhang, Q. Chen, J.-L. Han, Analytical method development for  $\alpha$ -amanitin and  $\beta$ -amanitin in plasma at ultra-trace level by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry and its application in poisoning events., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 190 (2020) 113523.
- [75] B. Králová, L. Fukal, P. Rauch, T. Ruml, *Bioanalytické metody*, 3rd ed., Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha, 2008.
- [76] S.D. Gan, K.R. Patel, Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *J. Invest. Dermatol.* 133 (2013) 1–3.

- [77] C.S. Bever, B. Barnych, R. Hnasko, L.W. Cheng, L.H. Stanker, A New Conjugation Method Used for the Development of an Immunoassay for the Detection of Amanitin, a Deadly Mushroom Toxin, *Toxins* . 10 (2018).
- [78] C.S. Bever, K.D. Swanson, E.I. Hamelin, M. Filigenzi, R.H. Poppenga, J. Kaae, L.W. Cheng, L.H. Stanker, Rapid, Sensitive, and Accurate Point-of-Care Detection of Lethal Amatoxins in Urine, *Toxins* . 12 (2020).
- [79] S. Göselová, M. Blažková, B. Holubová, L. Karamonová, P. Rauch, Imunodetekce v laterálním toku na membráně, *Chem. List.* 108 (2014) 114–119.
- [80] J. Gao, N. Liu, X. Zhang, E. Yang, Y. Song, J. Zhang, Q. Han, Utilizing the DNA Aptamer to Determine Lethal  $\alpha$ -Amanitin in Mushroom Samples and Urine by Magnetic Bead-ELISA (MELISA), *Molecules*. 27 (2022) 538.
- [81] X. Yang, Q. Cheng, V. Monnier, L. Charles, H. Karoui, O. Ouari, D. Gignes, R. Wang, A. Kermagoret, D. Bardelang, Guest Exchange by a Partial Energy Ratchet in Water, *Angew. Chemie Int. Ed.* 60 (2021) 6617–6623.
- [82] K. Bahrami, mohammad M. Khodaei, M. Soheilzad, A Novel, Practical Synthesis of Sulfonyl Chlorides from Thiol and Disulfide Derivatives, *Synlett.* 2009 (2009) 2773–2776.
- [83] G.K.S. Prakash, T. Mathew, C. Panja, G.A. Olah, Chlorotrimethylsilane–Nitrate Salts as Oxidants: Direct Oxidative Conversion of Thiols and Disulfides to Sulfonyl Chlorides, *J. Org. Chem.* 72 (2007) 5847–5850.
- [84] A. Nishiguchi, K. Maeda, S. Miki, Sulfonyl Chloride Formation from Thiol Derivatives by N-Chlorosuccinimide Mediated Oxidation, *Cheminform.* 38 (2007).
- [85] M.R. Rivero, J.C. De la Rosa, J.C. Carretero, Asymmetric Intermolecular Pauson-Khand Reactions of Unstrained Olefins: The [o-(Dimethylamino)phenyl]sulfinyl Group as an Efficient Chiral Auxiliary, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 14992–14993.

## 8. PŘÍLOHY

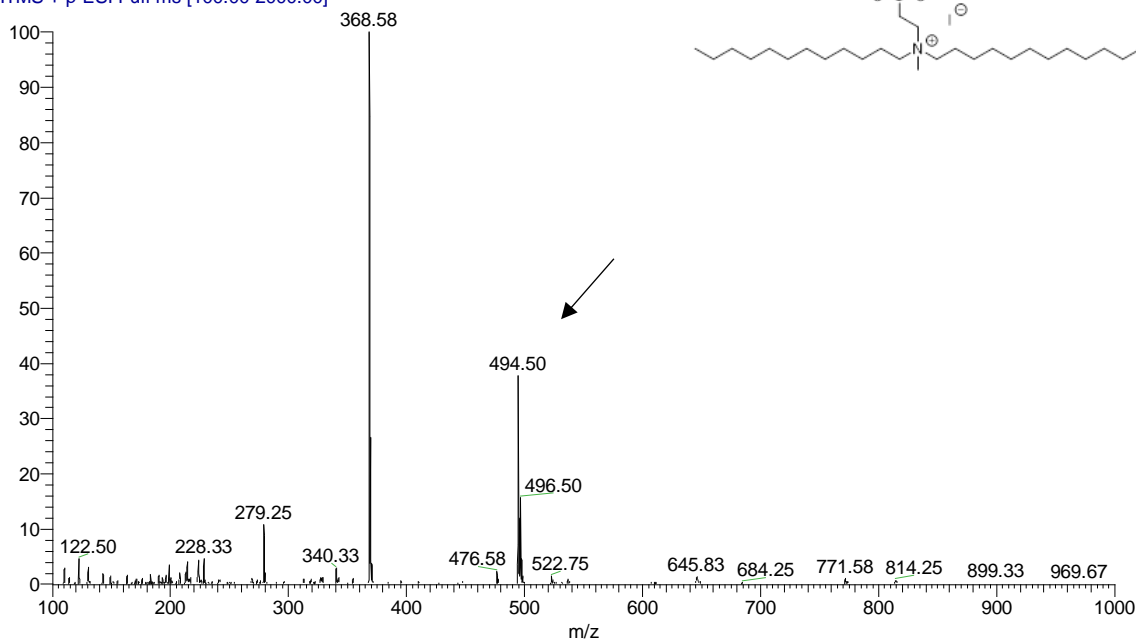
Příloha 13: Hmotnostní spektrum reakční směsi po alkylation cystaminu, produkt s m/z 427,58

rb\_214 #42-92 RT: 0.30-0.62 AV: 51 NL: 7.96E5  
T: ITMS + p ESI Full ms [50.00-1000.00]



Příloha 14: Hmotnostní spektrum reakční směsi po oxidaci alkylovaného cystaminu, produkt s m/z 494,50

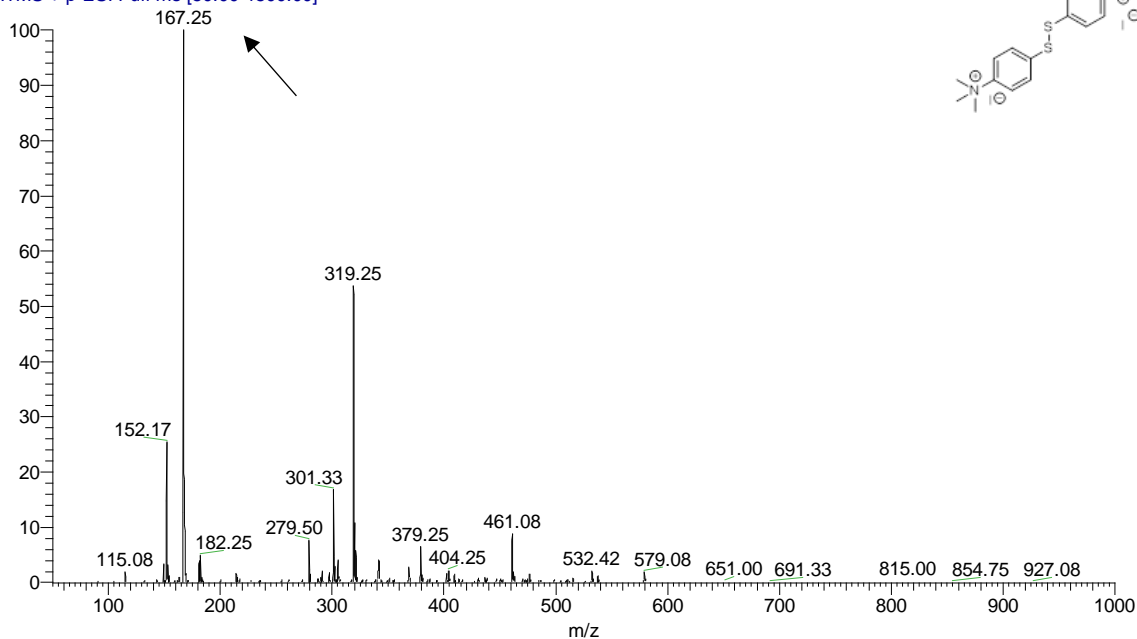
rb\_253 #33-64 RT: 0.32-0.62 AV: 32 NL: 1.60E5  
T: ITMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]





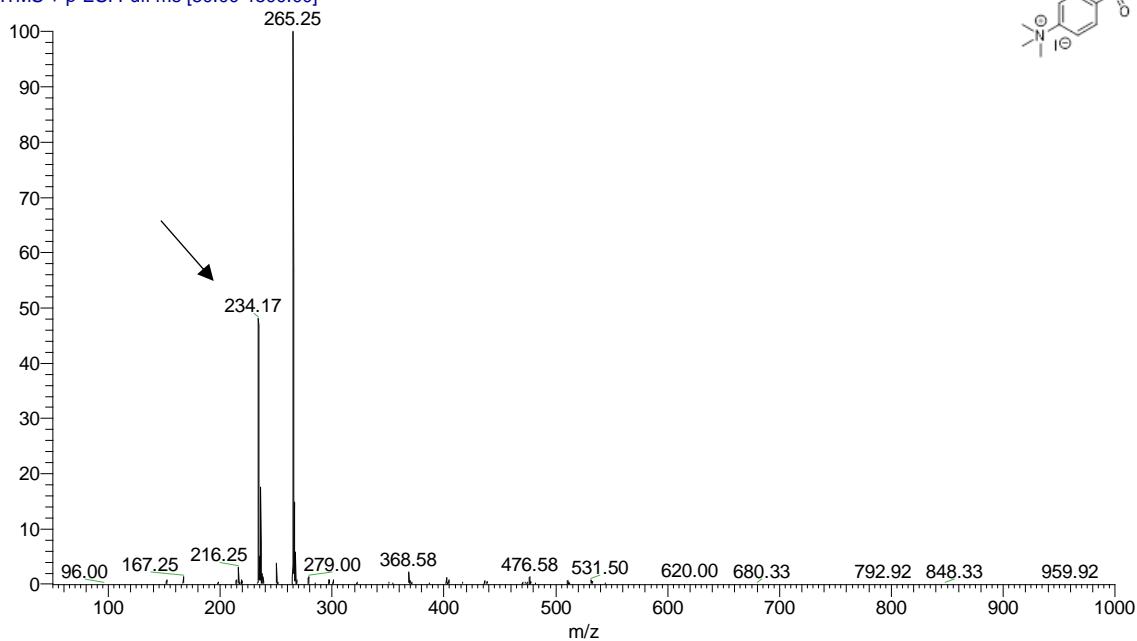
**Příloha 15:** Hmotnostní spektrum reakční směsi po alkylation 4-aminofenyl disulfidu, produkt s m/z 167,25

rb\_307 #35-60 RT: 0.35-0.60 AV: 26 SB: 17 0.02-0.19 NL: 1.24E4  
T: ITMS + p ESI Full ms [50.00-1500.00]



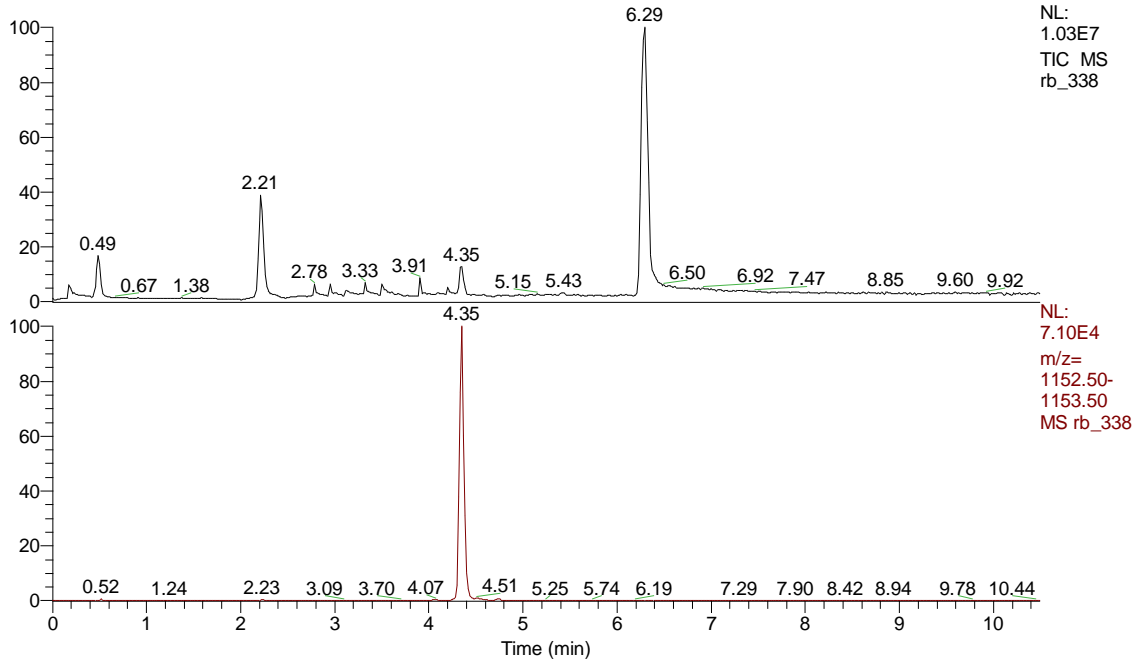
**Příloha 16:** Hmotnostní spektrum reakční směsi po oxidaci alkylovaného 4-aminofenyl disulfidu, produkt s m/z 234,17

rb\_308 #31-66 RT: 0.31-0.64 AV: 36 SB: 17 0.01-0.17 NL: 4.21E4  
T: ITMS + p ESI Full ms [50.00-1500.00]



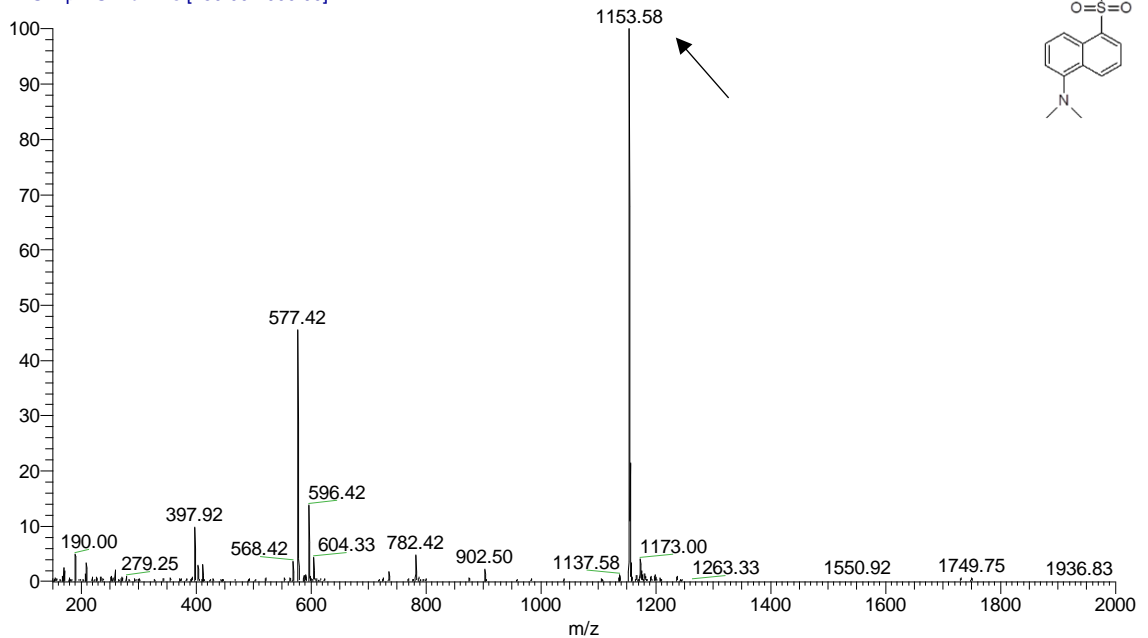
**Příloha 17:** Chromatogram reakční směsi dansylchloridu s  $\beta$ -amanitinem, retenční čas produktu 4,35 min

RT: 0.00 - 10.49



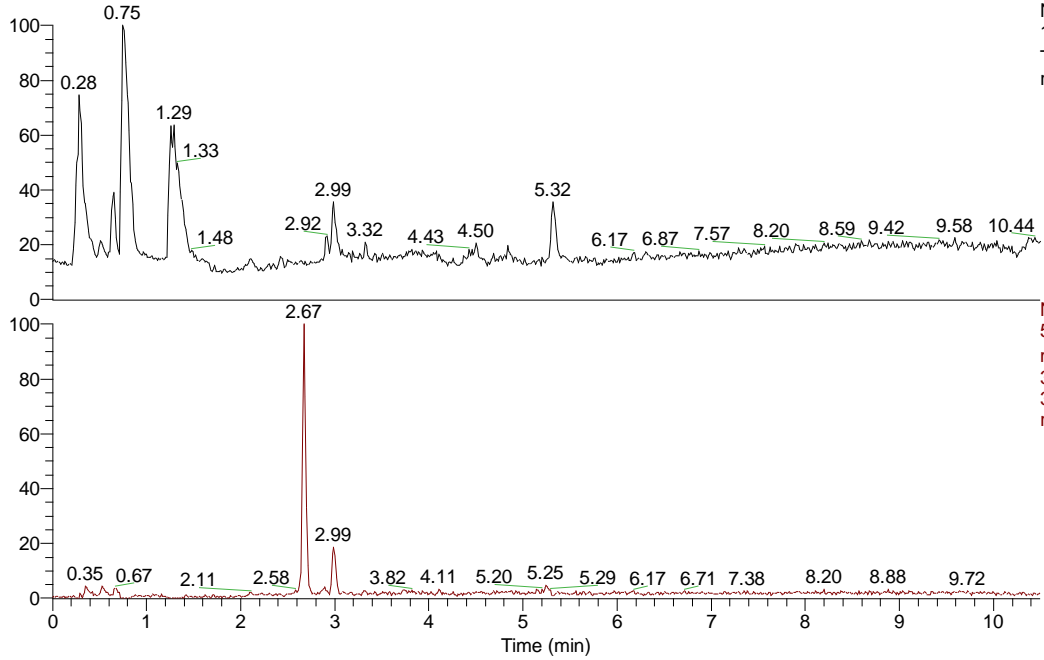
**Příloha 18:** Hmotnostní spektrum reakce dansylchloridu s  $\beta$ -amanitinem, koncentrace  $\beta$ -amanitinu 10  $\mu$ l/ml, produkt s m/z 1153,58

rb\_338 #232-240 RT: 4.28-4.42 AV: 9 NL: 1.58E4  
T: ITMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



**Příloha 19:** Chromatogram reakční směsi vanilinu a 4-(chlorsulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu, retenční čas produktu 2,67 min

RT: 0.00 - 10.49

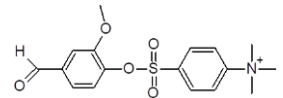
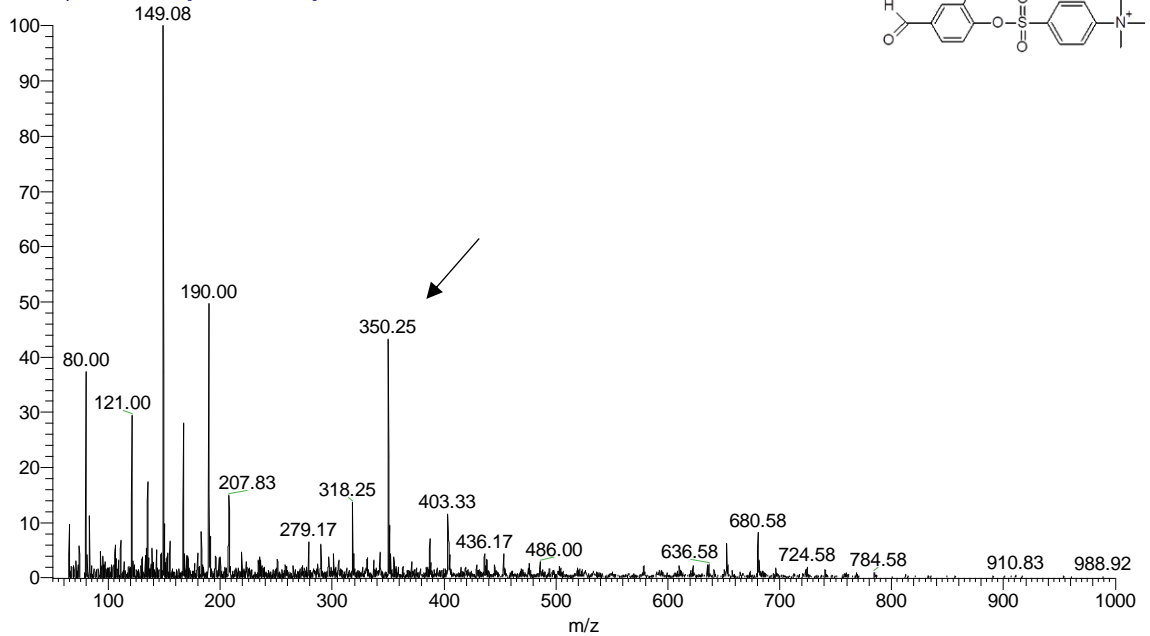


NL:  
1.26E6  
TIC MS  
rb\_352

NL:  
5.97E3  
m/z=  
349.50-  
350.50 MS  
rb\_352

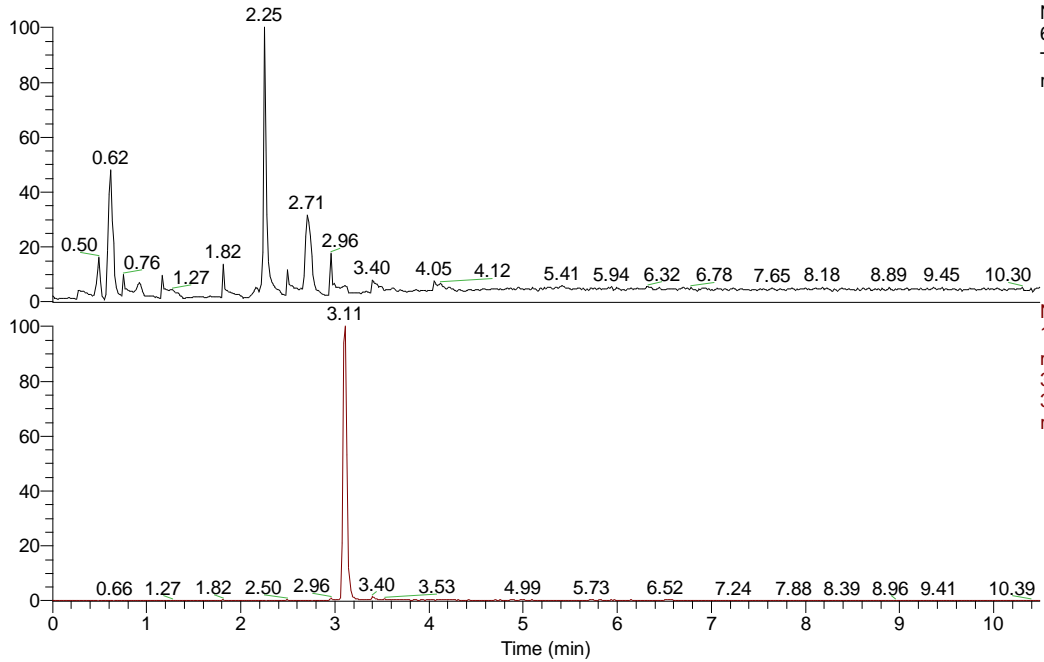
**Příloha 20:** Hmotnostní spektrum reakce vanilinu a 4-(chlorsulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu, koncentrace vanilinu 1  $\mu\text{g/ml}$ , produkt s  $m/z$  350,25

rb\_352 #189-191 RT: 2.66-2.68 AV: 3 NL: 2.18E3  
T: ITMS + p ESI Full ms [50.00-1000.00]



**Příloha 21:** Chromatogram reakční směsi kyseliny salicylové a 4-(chlorsulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu, retenční čas produktu 3,11 min

RT: 0.00 - 10.49

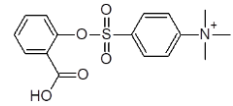
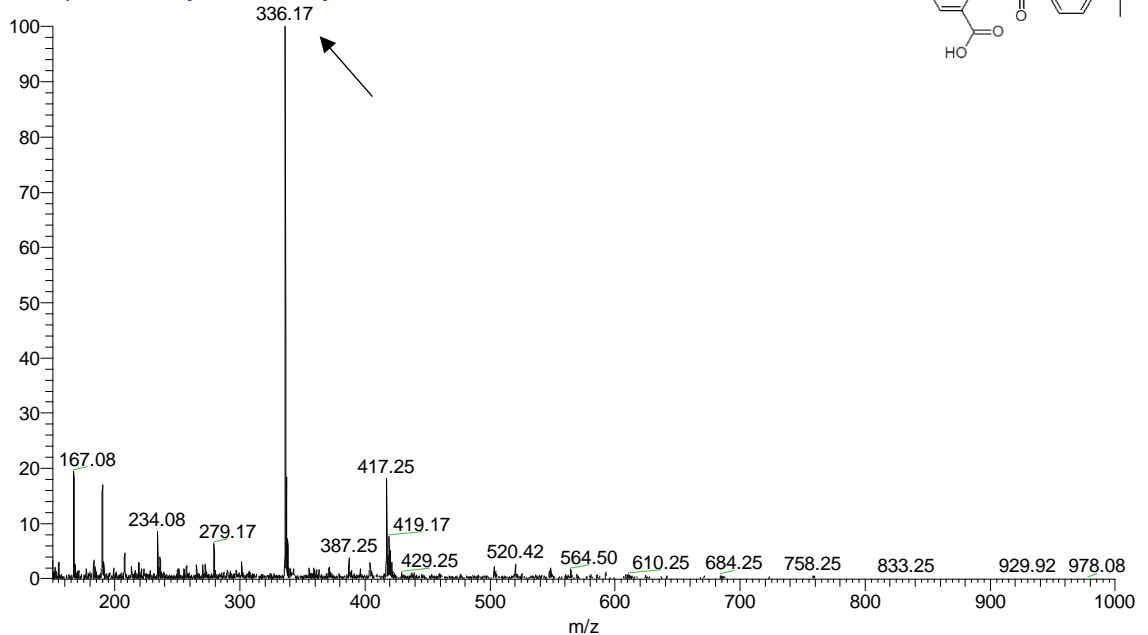


NL:  
6.18E6  
TIC MS  
rb\_344

NL:  
1.07E5  
m/z=  
335.50-  
336.50 MS  
rb\_344

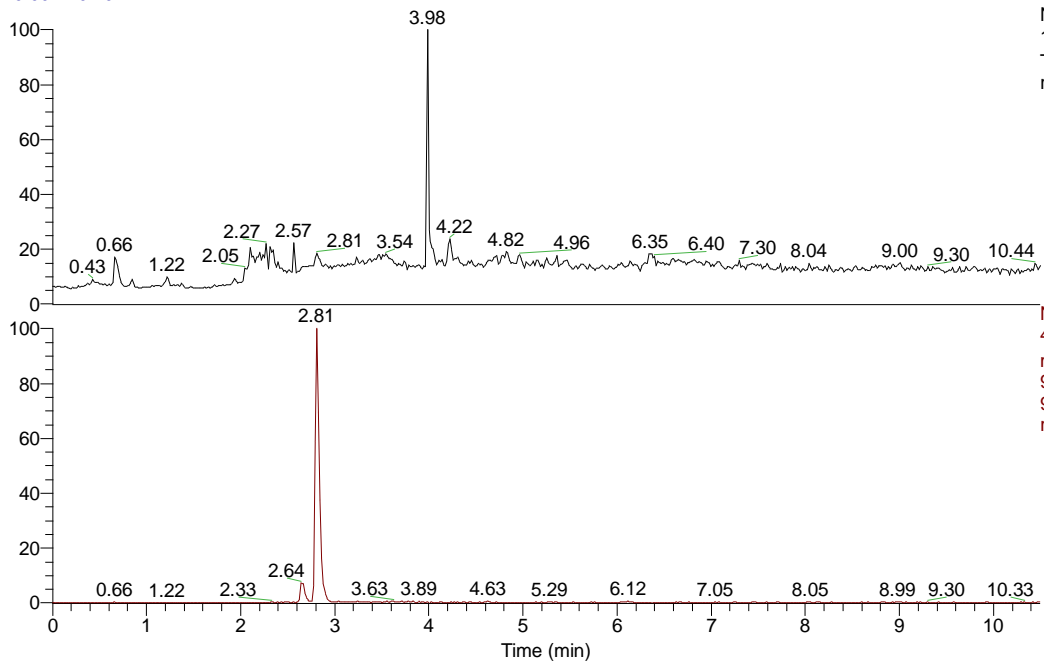
**Příloha 22:** Hmotnostní spektrum reakční směsi kyseliny salicylové a 4-(chlorsulfonyl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium jodidu, koncentrace kyseliny salicylové 1 µg/ml, produkt s *m/z* 336,17

rb\_344 #166-173 RT: 3.04-3.17 AV: 8 NL: 7.75E3  
T: ITMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



**Příloha 23: Chromatogram  $\beta$ -amanitinu, retenční čas 2,81 min**

RT: 0.00 - 10.49

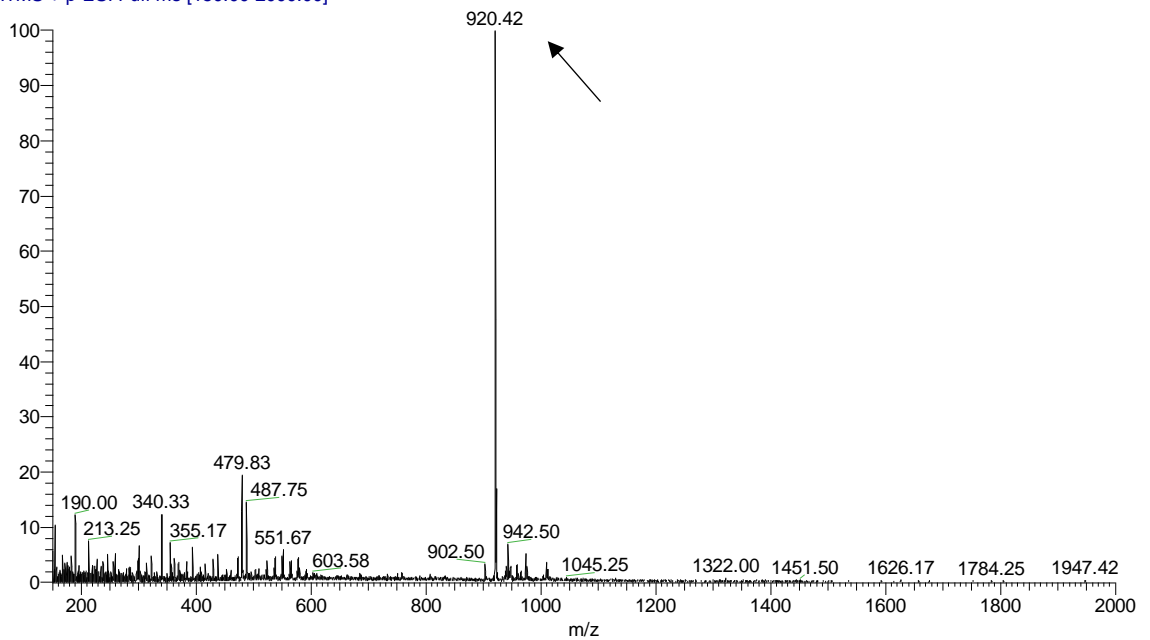


NL:  
1.91E6  
TIC MS  
rb\_239

NL:  
4.06E4  
m/z=  
920.00-  
921.00 MS  
rb\_239

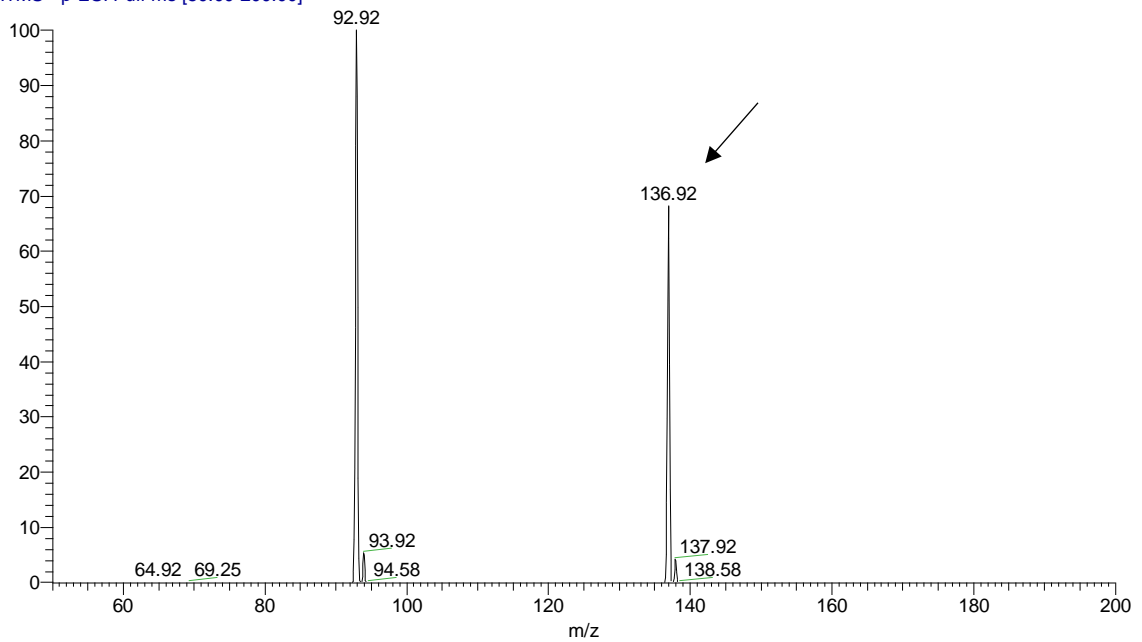
**Příloha 24: Hmotnostní spektrum  $\beta$ -amanitinu o koncentraci 1  $\mu$ g/ml s m/z 920,42**

rb\_239 #147-154 RT: 2.77-2.90 AV: 8 NL: 2.47E3  
T: ITMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



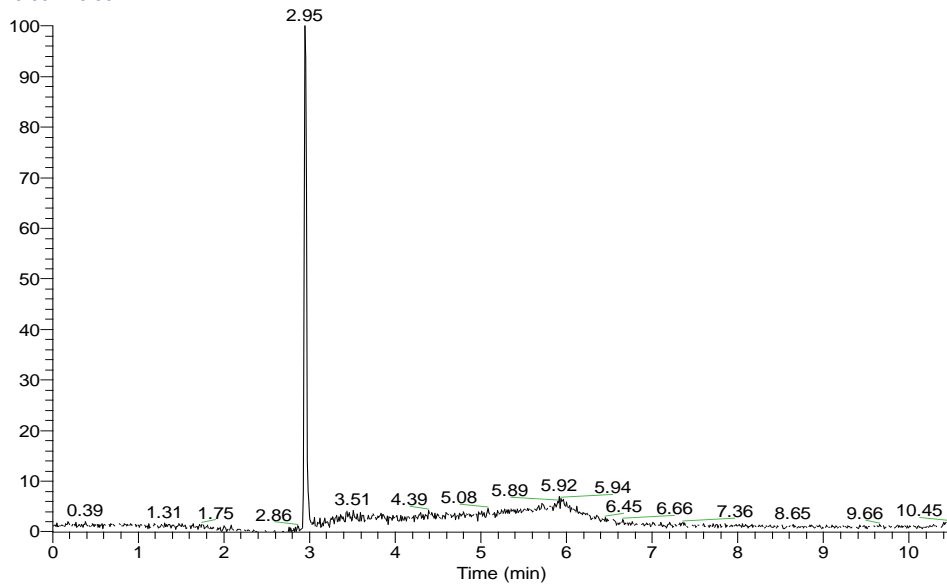
**Příloha 13:** Hmotnostní spektrum kyseliny salicylové o koncentraci 10 µg/ml s m/z 136,92

rb\_346 #628-642 RT: 3.83-3.91 AV: 15 NL: 1.42E3  
T: ITMS - p ESI Full ms [50.00-200.00]



**Příloha 14:** Chromatogram kyseliny salicylové, retenční čas 2,95 min

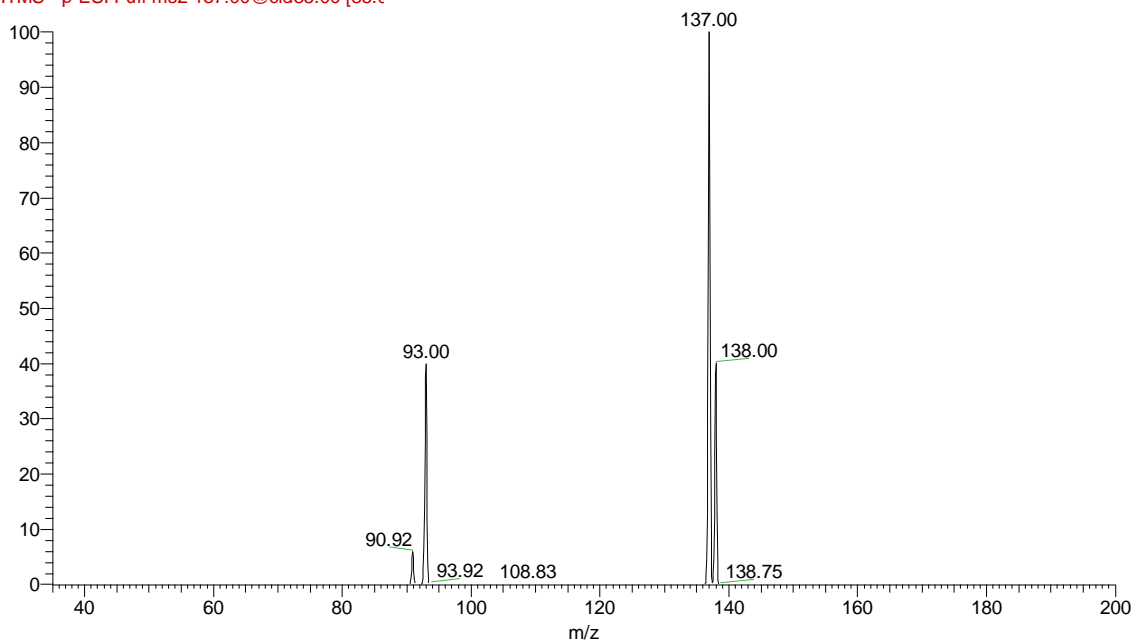
RT: 0.00 - 10.50



NL: 5.49E3  
m/z= 92.50-93.50 F:  
ITMS - p ESI Full ms2  
137.00@cid35.00  
[35.00-200.00] MS  
rb\_365

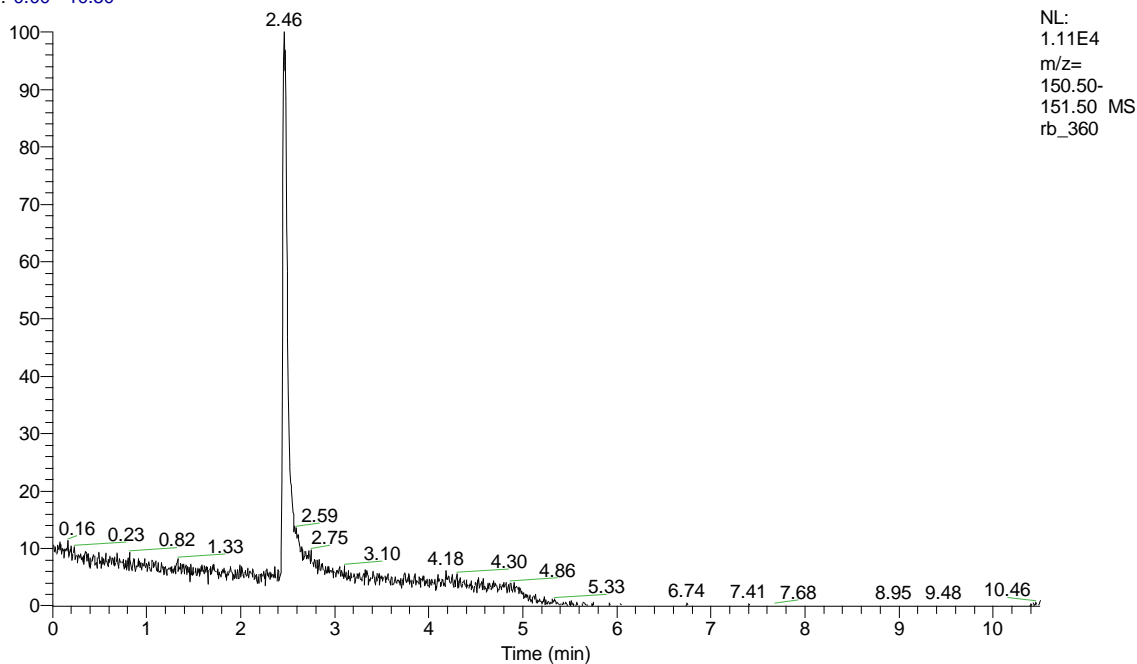
**Příloha 15: MS/MS spektrum kyseliny salicylové s m/z 137,00 a jejího fragmentu s m/z 93,00**

rb\_365 #574-589 RT: 2.92-2.99 AV: 8 NL: 1.39E3  
F: ITMS - p ESI Full ms2 137.00@cid35.00 [35.C



**Příloha 16: Chromatogram vanilinu, retenční čas 2,46 min**

RT: 0.00 - 10.50



NL:  
1.11E4  
m/z=  
150.50-  
151.50 MS  
rb\_360

**Příloha 17: Hmotnostní spektrum vanilinu o koncentraci 1 µg/ml m/z 150,92**

rb\_360 #389-422 RT: 2.40-2.61 AV: 34 NL: 1.88E4  
T: ITMS - p ESI Full ms [35.00-200.00]

