

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Barbora Merová

**MOŽNOSTI IZOLACE A PRŮKAZU TOXINŮ
MUCHOMŮRKY ČERVENÉ A TYGROVANÉ
METODOU LC/MS**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Peter Ondra, CSc.

Obor: Lékařská chemie a biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období říjen 2005 – září 2011.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury, kterou cituji.

V Olomouci dne 31.8.2011

.....
Mgr. Barbora Merová

Děkuji pracovníkům Ústavu soudního lékařství a medicínského práva LF UP a pracovníkům Ústavu soudního lékařství FN Ostrava za vytvoření dobrého pracovního prostředí a pomoc při řešení odborných problémů. Dále děkuji svému školiteli doc. RNDr. Peteru Ondrovi, CSc., RNDr. Marii Staňkové, Ph.D. a prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky, rady a předané zkušenosti během mého doktorského studia, při výzkumné části i při vlastním sepisování disertační práce.

Souhrn

Předkládaná disertační práce se zabývá izolací a průkazem toxinů muchomůrky červené a tygrované v biologickém materiálu (moč, sérum, žaludeční obsah).

V posledních letech se do popředí zájmu především mladých toxikomanů dostává experimentování s psychotropními druhy hub. Mezi tyto houby řadíme i muchomůrku červenou a tygrovanou (*Amanita muscaria* a *Amanita pantherina*). Zatímco u muchomůrky červené jde nejčastěji o úmyslnou konzumaci s cílem navození halucinogenního stavu, u muchomůrky tygrované se jedná většinou o náhodnou intoxikaci, způsobenou její záměnou s jedlými druhy hub. Hlavními obsahovými látkami těchto hub jsou kyselina ibotenová a muscimol (deriváty isoxazolu) a muskarin. Tyto látky, velmi podobné neurotransmiterům v mozku, jsou schopny vyvolat neurotoxické symptomy u uživatelů.

Přestože intoxikace těmito houbami jsou zřídka smrtelné, je důležité jejich včasné rozpoznání a zahájení léčby. Problémem v soudobé klinické a forenzní toxikologii je absence objektivní analytické metody pro průkaz a stanovení účinných látek těchto hub z biologického materiálu intoxikovaných. Doposud se k diagnostice otrav používají subjektivní mikroskopické metody.

Cílem bylo vytvořit objektivní LC/MS metodu pro rychlou diagnostiku intoxikace těmito houbami. Experimenty byly provedeny na přístroji LC/MS-ESI. V metodě pro průkaz toxinů byla měření provedena na koloně Gemini C18 s užitím 8 mmol.l⁻¹ kyseliny heptafluoromáselné jako mobilní fáze. Za těchto chromatografických podmínek byly sledovány ionty m/z 159 pro kyselinu ibotenovou, m/z 115 pro muscimol a m/z 174 pro muskarin. V metodě pro stanovení muskarinu byla měření provedena na koloně Gemini C18 s užitím mobilní fáze složené z 8 mmol.l⁻¹ kyseliny heptafluoromáselné a acetonitrilu. Sledované ionty byly m/z 174 pro muskarin a m/z 216 pro acetylovaný muskarin. Pro izolaci toxinů z moče byla použita extrakce na pevné fázi, nejlepší výsledky extrakce muskarinu byly dosaženy na kolonce Strata X-CW a kyseliny ibotenové a muscimolu na kolonce Discovery SCX.

Podařilo se nalézt metodu kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro analýzu hlavních toxinů muchomůrek červené a tygrované – ibotenovou kyselinu,

SOUHRN

muscimol a muskarin. Metodu lze rovněž použít při objasňování intoxikací způsobených jinými druhy hub, obsahujícími tyto toxiny.

Klíčová slova: *Amanita muscaria*, *Amanita pantherina*, kyselina ibotenová, muscimol, muskarin, LC/MS, průkaz, stanovení.

Summary

The present thesis is focused on the isolation and identification of *Amanita muscaria* and *Amanita pantherina* toxins in biological material, such as urine, blood or gastric content.

Over the past years, experimenting with psychotropic mushrooms, especially among young drug addicts, has been brought to the foreground of interest. Among such mushrooms we include *Amanita muscaria* and *Amanita pantherina* as well. While *Amanita muscaria* is deliberately consumed with the aim of evoking a hallucinogenic state, with *Amanita pantherina* it is mostly an accidental intoxication, when mistaken for some edible mushrooms. The major toxins contained in these *Amanitas* are ibotenic acid and muscimol (isoxazole derivates) and muscarine. These toxins, very similar to nerve transmitters in the brain, are able to give cause for hallucinogenic symptoms in their users.

Although intoxications through these mushrooms are rarely lethal, it is important to determine them soon and initiate a medical treatment. The problem of today's forensic toxicology is the absence of an objective analytical method for identification and determination of the mushrooms' toxins from biological materials of patients. Nowadays, the diagnosis of these mushroom poisonings is almost entirely determined by subjective microscopic examinations.

The aim of the project was to elaborate and introduce an objective LC/MS method for rapid and reliable diagnosis of intoxications by these mushroom toxins.

The experiments were carried out using an LC/MS equipped with electrospray ionization. In the method for toxins identification, the separation of the toxins was achieved on a Gemini C18 column with 8 mmol.l⁻¹ heptafluorobutyric acid as the mobile phase. Under the described chromatographic conditions, intensive ions at m/z 159 for ibotenic acid, m/z 115 for muscimol and m/z 174 for muscarine were observed. In the method for muscarin determination, the measurement was achieved on a Gemini C18 column with 8 mmol.l⁻¹ heptafluorobutyric acid and acetonitril as the mobile phase. Under the described chromatographic conditions, intensive ions at m/z 174 for muscarine and m/z 216 for acetyled muscarine were observed. Solid phase extraction

SUMMARY

was applied for isolation of the toxins from urine, Strata X-CW column for muscarine and Discovery SCX column for ibotenic acid and muscimol.

A liquid chromatography-mass spectrometry assay was developed for analysis of principal toxins of *Amanita muscaria* and *Amanita pantherina*. The method can be used for explication of intoxication caused by another mushrooms containing the same toxins.

Keywords: *Amanita muscaria*, *Amanita pantherina*, ibotenic acid, muscimol, muscarine, LC/MS, identification, determination.

<u>ABECEDNÍ SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</u>	8
<u>1. ÚVOD</u>	10
<u>2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</u>	12
<u>3. TEORETICKÁ ČÁST</u>	13
<u>3.1. Úvod do problematiky</u>	13
<u>3.2. Houbové intoxikace</u>	13
<u>3.3. Historie užívání halucinogenních hub z rodu <i>Amanita</i></u>	16
<u>3.4. Houby obsahující kyselinu ibotenovou, muscimol nebo muskarin</u>	17
<u>3.5. Toxiny odpovědné za psychotropní efekt</u>	22
<u>3.5.1. Kyselina ibotenová a muscimol</u>	22
<u>3.5.2. Muskarin</u>	24
<u>3.5.3. Muskazon</u>	25
<u>3.5.4. Kyseliny stizolobová a stizolobinová</u>	25
<u>3.6. Popis halucinogenních účinků hub z rodu <i>Amanita</i> z pozice intoxikovaného</u>	26
<u>3.7. Analytické metody použité k identifikaci, popř. stanovení kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu z hub rodu <i>Amanita</i></u>	29
<u>3.9. Toxikologické vyšetření a odběr biologického materiálu</u>	34
<u>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</u>	35
<u>4.1. Biologický materiál</u>	35
<u>4.2. Chemikálie</u>	35
<u>4.3. Ostatní materiál</u>	36
<u>4.4. Příprava zásobních roztoků standardů</u>	37
<u>4.5. Použitá instrumentace</u>	37
<u>4.6. Volba iontového zdroje</u>	37
<u>4.7. Nalezení vhodných parametrů MS (kvadrupól)</u>	40
<u>4.8. Určení podmínek LC</u>	40
<u>4.9. Měření fragmentačních spekter</u>	42
<u>4.10. Izolační metody</u>	43

4. 10. 1. Extrakce kapalina-kapalina (LLE)	43
4. 10. 2. Extrakce na pevné fázi (SPE)	43
4. 11. Validace metody pro stanovení muskarinu	47
4.11.1. Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem	47
4.11.2. Roztoky standardů	47
4.11.3. Metoda izolace muskarinu z moče	48
4.11.4. Selektivita	48
4.11.5. Linearita	48
4.11.6. Preciznost a přesnost	48
4.11.7. Limit detekce a limit kvantifikace	48
4.11.8. Výťažnost	49
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	50
5. 1. Volba iontového zdroje	50
5. 2. Nalezení vhodných parametrů MS	52
5. 3. Určení podmínek LC	56
5. 4. Měření fragmentačních spekter	62
5.4.1. Fragmentace kyseliny ibotenové	65
5.4.2. Fragmentace muscimolu	66
5.4.3. Fragmentace muskarinu	67
5.4.4. Fragmentace acetylovaného muskarinu	68
5. 5. Izolační metody	69
5. 5. 1. Extrakce kapalina-kapalina (LLE)	69
5. 5. 2. Extrakce na pevné fázi (SPE)	69
5. 6. Validace metody pro stanovení muskarinu v moči	77
5.6.1. Metoda extrakce muskarinu z moče	77
5.6.2. Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem	77
5.6.3. Linearita	78

OBSAH

5.6.4. Preciznost a přesnost	78
5.6.5. Limit detekce a limit kvantifikace	79
5.6.6. Výtěžnost	79
5.7. Použití metody LC/MS k identifikaci sledovaných toxinů v moči, séru a žaludečním obsahu intoxikovaných pacientů	81
6. ZÁVĚR	89
7. SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍ SE K DISERTACI	91
Publikace	91
Prezentace	93
8. OSTATNÍ PRÁCE	95
Publikace	95
Prezentace	95
9. CITACE	97

Abecední seznam použitých zkratk

Ach	acetylcholin
ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APCI-	chemická ionizace za atmosférického tlaku v záporném módu
APCI+	chemická ionizace za atmosférického tlaku v kladném módu
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CDL	curve desolvation line
cGMP	cyklický guaninmonofosfát
CNS	centrální nervová soustava
CV	variační koeficient
d. w.	dry weight - „suchá hmotnost“
DMSO	dimethylsulfoxid
DNS-Ibo	dansyl chlorid-ibotenová kyselina
DNS-Mus	dansylchlorid-muscimol
ECF	ethylchloridmravenčan
ESI	ionizace elektrosprejem
ESI-	ionizace elektrosprejem v záporném módu
ESI+	ionizace elektrosprejem v kladném módu
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GC	plynová chromatografie
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
GLC	plynová rozdělovací chromatografie
HFMK	heptafluoromáselná kyselina
HILIC	kapalinová chromatografie založená na hydrofilních interakcích
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
LD50	letální dávka, která u 50 % jedinců způsobí smrt

L-DOPA	levodopa
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MF	mobilní fáze
MFA	mobilní fáze A
MFB	mobilní fáze B
m/z	poměr hmoty a náboje
M ⁺	molekulární ion
M+H ⁺	protonizovaná molekula (kvazimolekulární ion)
M _R	molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometr
PřF UP	Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého
PSL	pocení, slinění, slzení (perspirace, salivace, lakrimace)
RT	retenční čas
RSD	relativní směrodatná odchylka
SIM	mód monitorování zvolených iontů
SPE	extrakce na pevné fázi
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TMCS	trimetylchlorosilan
UV	ultrafialová oblast

1. Úvod

Zneužívání návykových látek v České republice dosáhlo nebývalého rozmachu v devadesátých letech minulého století v tzv. porevolučním období. V této době dochází také k výrazným změnám ve spektru zneužívaných drog. Nejčastěji jsou v České republice zneužívány návykové látky na bázi amfetaminů (Pervitin, Extáze) a kanabinoidů (marihuana, hašiš). V posledních letech lze ze sociálních serverů vysledovat nárůst zájmu o experimentování s psychotropními druhy hub. Kromě nejvíce oblíbených lysohlávek jde hlavně o muchomůrku červenou. Rovněž nelze opomenout muchomůrku tygrovanou. U této houby jde spíše o otravy náhodné, vyskytující se hlavně v období houbařské sezóny, které jsou způsobené záměnou za jedlé druhy hub.

Psychotropní účinek muchomůrky červené a tygrované je vyvolán především isoxazolovými deriváty (kyselina ibotenová a muscimol) a muskarinem. Kyselina ibotenová je konformační derivát kyseliny glutamové a muscimol kyseliny γ -aminomáselné (GABA). Muscimol, který vzniká dekarboxylací kyseliny ibotenové, je silný GABA-agonista. Obě látky působí jako falešné neurotransmitery (1 - 4). Vyvolávají únavu, nepokoj, závratě, halucinace, midriázu, desorientaci, stavy krajního vzrušení střídané s depresi, motorický neklid, svalové záškuby až křeče, dochází k pozvolnému přechodu do různě hlubokého komatózního stavu (1, 2, 5 - 7).

Muscarin se díky své struktuře dobře váže na cholinergní receptory, čímž působí na tu část periferního nervového systému, která využívá acetylcholin jako mediátoru na postgangliovém zakončení parasympatických vláken. Symptomy otravy se projevují 30 – 120 min od požití, zahrnují miózu, nejasné vidění, zvýšené pocení, slinění a slzení (tzv. PSL syndrom), zpomalení srdeční činnosti, snížení krevního tlaku, astmatické dýchání (1, 5 – 8, 9).

Přesto, že intoxikace těmito houbami jsou zřídka smrtelné, mohou u uživatelů vyvolat vážné zdravotní problémy, které se projevují celou řadou neurotoxických symptomů. Nebezpečí spočívá také ve variabilitě zastoupení uvedených toxinů v jednotlivých plodnicích houby, které je závislé na vegetačním období houby, na lokalitě růstu hub a na řadě dalších faktorů. Tato skutečnost rovněž významně zvyšuje nebezpečí možné intoxikace při zneužívání těchto hub toxikomany.

V současné době se k diagnostice intoxikací těmito houbami používá subjektivní mikroskopická metoda, která zkoumá zbytky výtrusů v žaludečním obsahu, popř. stolici intoxikovaného či ve zbytcích jídla. Pro rychlou a spolehlivou diagnostiku intoxikací těmito houbami chybí v klinické a forenzní toxikologii analytické metody, vhodné k průkazu a stanovení těchto látek v biologickém materiálu (moč, krev, žaludeční obsah) intoxikované osoby. Přestože bylo publikováno několik prací popisujících izolaci a stanovení těchto látek analytickou metodou, vždy šlo o stanovení přímo z hub.

Předkládaná práce je zaměřená na vývoj analytické metody k rychlé a objektivní analýze kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu z moče intoxikovaných osob, která by byla použitelná v rutinní toxikologické praxi.

2. Cíle disertační práce

Cílem předkládané disertační práce bylo vypracování metody izolace a průkazu, popř. stanovení toxinů muchomůrky červené a muchomůrky tygrové v biologickém materiálu pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC/MS).

Její cíle lze shrnout do následujících bodů:

1. Nalezení vhodných separačních podmínek pro identifikaci, popř. stanovení kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu metodou LC/MS
2. Nalezení vhodného extrakčního postupu pro izolaci kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu z biologického materiálu.
3. Validace metody stanovení muskarinu v moči
4. Aplikace nalezených analytických postupů na reálné vzorky pacientů

3. Teoretická část

3.1. Úvod do problematiky

Každý rok dochází v České republice k řadě houbových intoxikací. Mezi nejzávažnější otravy patří intoxikace houbami z rodu *Amanita* (muchomůrky). V současné době se při vyšetřování houbových otrav využívá subjektivní mikroskopické metody, která v sobě ovšem zahrnuje řadu úskalí – od nevhodného odběru vzorku (např. špatný odběr žaludečního obsahu, kdy je k vyšetření dodán čirý výplach po lavážích žaludku, již bez přítomnosti spor) až po nedostatečnou erudovanost odborníka, který vyšetření provádí. S rozvojem a zaváděním moderních analytických metod do toxikologických laboratoří, především plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC/MS) a kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC/MS), je snahou vytvořit vhodné analytické postupy k objektivnímu posouzení houbových intoxikací.

3.2. Houbové intoxikace

Houbové jedy neboli mykotoxiny, vznikají jako přírodní produkty metabolismu hub, jejich biosyntéza však není spjata se základními procesy při tvorbě biomasy. Většinu toxinů proto považujeme za sekundární mykotoxiny. Existuje několik teorií, proč houby tvoří jedovaté látky, často s vysokou toxicitou pro živé tvory. Dosud neexistuje všeobecně uznávaná teorie o významu produkce toxinů houbami. Toxiny jsou totiž chemicky velmi různorodé a mají rozmanitý mechanismus účinku na buňku.

Výskyt otrav houbami v České republice je poměrně častý, protože široké vrstvy obyvatelstva mají o sběr a požívání jedlých hub velký zájem. Indikace otrav houbami je proto větší v období jejich růstu, v tzv. houbařské sezóně. Nejčastější otravy houbami vznikají požitím jedovatých hub, záměnou za houby jedlé. Ale i jedlé houby se mohou za některých okolností stát příčinou otravy. Otravy nepřímým požitím toxinů jedovatých hub (např. u kojenců při kojení matky) jsou velmi vzácné (10).

Podle mechanismu působení toxinů se rozlišuje několik typů syndromů (1, 11, 12):

1. Antabusový syndrom
2. Faloidní – hepatorenální syndrom
3. Gastroenterodyspeptický syndrom
4. Mykoatropinový – neurotoxický syndrom
5. Muskarinový syndrom
6. Nefrotoxický syndrom
7. Psychotropní – psilocybinový syndrom
8. Pseudootravy

Z hlediska toxicity jsou nejvýznamnějšími houbami muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*), muchomůrka červená (*Amanita muscaria*) a muchomůrka tygrovaná (*Amanita pantherina*). Muchomůrky červená a tygrovaná jsou pro svoje psychotropní účinky zneužívány především mladými lidmi. Muchomůrka tygrovaná je rovněž zaměňována při sběru hub pro svou podobu s jedlou houbou - muchomůrkou růžovou.

Muchomůrka červená a tygrovaná patří podle svých toxinů do skupiny způsobujících při otravách mykoatropinový-neurotoxický syndrom a muskarinový syndrom. Muskarinový syndrom otravy může být vyvolán i požitím hub z rodu vlácnic – *Inocybe* a strmělek – *Clitocybe*, v jejichž některých druzích byla potvrzena přítomnost muskarinu a to až ve stonásobně vyšší koncentraci, než je tomu u muchomůrky červené a tygrované.

Mykoatropinový – neurotoxický syndrom

- houba: muchomůrka tygrovaná – *Amanita pantherina*, muchomůrka červená – *Amanita muscaria*, *Amanita cothurnata*, muchomůrka slámožlutá – *Amanita gemmata*, muchomůrka královská – *Amanita regalis*
- toxin: kyselina ibotenová, muscimol
- příznaky intoxikace: bezpříznakové období otravy těmito houbami je poměrně krátké: 1 – 4 hodiny (s variací od 30 minut do 7 hodin). Mezi počátečními

příznaky mohou být známky působení muskarinu – zvýšené slinění, slzení a pocení, bolesti břicha, zvracení. Tyto příznaky posléze pominou a nastává excitační období, kdy má postižený pocity horka a mravenčení na kůži celého těla, pocit neobvyklé lehkosti, touží po pohybu (tento pohyb je však brzy nekoordinovaný). Psychické vzrušení se stupňuje a projevuje se logorrhoeou (vyjadřující inkoherentní myšlení), ztrátou kontaktu s okolím a halucinacemi. Stupňuje se motorický neklid – bezúčelné pohyby, obličejové grimasy, křečovitě záškuby, diskoordinace pohybů. Celkové vzrušení je provázáno hyperkinetickým oběhovým syndromem. Prožívá-li pacient excitační stádium ve spánku, mívá halucinační sny a zpravidla se probouzí až zvracením. Snové stavy jsou prožívány buď s pocitem přechodu do posmrtného života nebo s pocitem depersonalizace. Excitační období pak plyne, během několika hodin, přechází do období komatózního, které trvá několik hodin. Pacient je v různě hlubokém kómatu, z něhož se však může i spontánně probudit, s projevy zvýšené nervosvalové dráždivosti, s poklesem krevního tlaku. Po probuzení z kómatu mívá intoxikovaný často pocit reinkarnace. Někdy přetrvávají, i několik dní, poruchy koordinace pohybů a poruchy řeči.

Prognóza otrav je celkem příznivá, úmrtnost je pouze ve 2 až 5 %. Otrava končící smrtí nastává hlavně u malých dětí nebo starších osob (1, 2).

- terapie: výplach žaludku, aktivní uhlí, projímadlo, symptomatická léčba

Muskarinový syndrom

- houba: houby z rodu strmělka – *Clitocybe*, z rodu vláknice – *Inocybe*, muchomůrka červená – *Amanita muscaria*, muchomůrka tygrovaná – *Amanita pantherina* a muchomůrka královská – *Amanita regalis*
- toxin: muskarin, vyvolává zvýšený tonus parasympatiku působením na muskarinové receptory (tzv. M-receptory lokalizované ve svalech a žlázách)
- příznaky intoxikace: doba latence je 0,5 – 4 hodiny. Objevuje se nevolnost, mlhavé vidění, pocení, slinění a slzení (tzv. PSL syndrom), bledost, poruchy

srdečního rytmu, průjem, zvracení. Nápadné je zúžení zorniček. Projevem účinku na receptory je slabost až třes svalstva, křeče jazyka a tonicko-klonické křeče (1, 2, 8)

➤ terapie: podání atropinu jako antidota

3.3. Historie užívání halucinogenních hub z rodu *Amanita*

Sóma, božské narkotikum starověké Indie, zaujímala důležitou úlohu v magicko-náboženských obřadech Árijců, kteří před 3500 lety osídlili Indoganžskou nížinu. Tito staří obyvatelé vyznávali kult Sómy spojený s uctíváním posvátného narkotika, jehož extrakt pili jen při nejvýznamnějších obřadech. Lidé většinou považovali halucinogenní rostliny za pouhé prostředníky mezi člověkem a bohy, avšak Sóma byla pro své věřící ztělesněním samotného boha. Ve staroindické Rgvédě (patří mezi nejstarší indickou náboženskou literaturu) se píše, že „otcem Sómy je Pardžanda, bůh hromu“. Indická Rgvéda obsahuje přes tisíc posvátných hymnů, z nichž 120 je zasvěcených výhradně Sómě a mnoho dalších se o této rostlině svátosti alespoň zmiňuje. Kult Sómy však začal postupně ztrácet na svém významu, původní účel posvátné rostliny upadl v zapomnění a její pozici zaujaly různé rostlinné náhražky, jež však už postrádaly psychotropní vlastnosti. Přesto můžeme bez obav říci, že muchomůrka červená byla pravděpodobně nejstarším a nejrozšířenějším halucinogenem, které kdy lidstvo poznalo.

Původ Sómy byl až donedávna zahalen tajemstvím. Etnobotanický výzkum se dlouhá léta marně pokoušel odhalit starověkou záhadu, ale teprve v roce 1968 se díky důkladnému mezivědnímu výzkumu podařilo získat přesvědčivé důkazy, které potvrzují, že záhadným posvátným narkotikem byla muchomůrka červená.

V západním světě byly halucinogenní vlastnosti muchomůrky červené známy již od roku 1730. Jeden švédský důstojník, který strávil dvanáct let v sibiřském zajetí, o svém pobytu vypověděl, že šamani primitivních sibiřských kmenů používají muchomůrku červenou jako narkotikum. Mezi roztroušenými skupinami sibiřských Ugrofinů tento zvyk přetrval dodnes a lze se domnívat, že muchomůrka se používá i mezi dalšími skupinami obývajícími tuto rozlehlou oblast. Houby se nejprve usušily na slunci a potom přímo jedly, nebo se nechaly vylouhovat ve vodě, sobím mléku či sladké

šťávě některých rostlin. Pokud se houby jedly sušené, nechaly se v ústech nejprve důkladně zvlhnout. Domorodci věděli, že obsažené psychotropní látky se z těla vylučují v nezměněné podobě, a proto ve svých obřadech zavedli rituální pití moče.

Halucinogenních účinků muchomůrky červené se zřejmě občas využívalo i ve Střední Americe. Muchomůrka červená roste v horských oblastech jižního Mexika a Guatemaly. První osídlenci, pronikající přes Beringovu úžinu, po sobě zanechali mnoho pozůstatků asijské kultury. Náleží k ní i magicko náboženské používání muchomůrky červené, které je na americkém kontinentě dodnes živé.

Halucinogenní účinky muchomůrky červené mají nepochybně svůj význam i v kultuře Athabasků, kmene, žijícího v oblasti Mackenzieho pohoří v severozápadní Kanadě. Šamani muchomůrku červenou používají při obřadech jako symbol svátosti. (13, 14).

3.4. Houby obsahující kyselinu ibotenovou, muscimol nebo muskarin

Jak již bylo zmíněno, nejznámějšími houbami obsahující kyselinu ibotenovou, muscimol a muskarin jsou muchomůrka červená, tygrovaná a královská, kterou někteří autoři považují za samostatný druh, jiní za varietu muchomůrky červené. Muscimol a kyselina ibotenová byly rovněž prokázány i v muchomůrce *Amanita cothurnata*, která se v naší zeměpisné poloze nevyskytuje. Přítomnost muscimolu a kyseliny ibotenové v muchomůrce slámožluté – *Amanita gemmata* je sporná, jelikož ne vždy tyto látky byly v houbě prokázány (15, 16). Muskarin byl rovněž prokázán v některých druzích hub z rodu strmělek a vláknic (17, 18).

Muchomůrka červená – *Amanita muscaria*

Díky svému červenému klobouku (10 - 25 cm široký) je muchomůrka červená velmi výrazná a zřídka dochází k její záměně s jiným druhem hub. Větší část plachetky, která zakrývala mladou plodnici, se rozčleňuje v útržky, které zdobí povrch klobouku. Bílá třeň, která může být vysoká až 25 cm a má v horní části bílý prsten, je na spodině rozšířena v kuželovitě ukončenou vejčitou hlízu. Výtrusy jsou vejčitě elipsodní (19).

Tato houba se vyskytuje v oblasti celého mírného pásu. Vyskytuje se především v jehličnatých a smíšených lesích, nejčastěji pod smrky, borovicemi, břízami, modříný a duby (20). Symbiotický vztah mezi buňkami kořenů těchto stromů a podhoubím je pro růst plodnice nezbytný, bez nich plodnice nevyroste (21). V České republice můžeme růst muchomůrky červené pozorovat od srpna až do listopadu (19).



Muchomůrka královská – *Amanita regalis*

Klobouk je široký 8 - 16 cm, polokulovitý, klenutý až celkem plochý, stejně jako u muchomůrky červené, od níž se liší barvou pokožky i zbytků plachetky. Pokožka je játrově žlutohnědá až hnědá. Lupeny jsou husté, bělavé nebo žlutavě okrové. Třeň je dlouhá 6 - 16 cm, válcovitá, dutá, bělavá nebo s okrovým nádechem. V horní části nese velký prsten stejného odstínu. Na bázi je rozšířen v hlízu, zdobenou v několika pásech

bradavkami. Chut' i vůně jsou nenápadné. Výtrusy jsou elipsoidní, hladké a bezbarvé. Někteří autoři ji považují za samostatný druh, jiní za varietu muchomůrky červené (19).

Roste od srpna do října (nejvíce v září) v podhorských smrčínách, dost často ve společnosti muchomůrky červené nebo i hříbu smrkového. Více roste v lesích severní Evropy (21).



Muchomůrka tygrovaná – *Amanita pantherina*

Muchomůrka tygrovaná má klobouk zprvu kulovitý, v dospělosti plochý, tmavě okrově žlutý až okrově hnědý, 5 - 12 cm široký. Stejně jako u muchomůrky červené je klobouk zdoben bílými bradavkami, které jsou někdy velmi pravidelně uspořádány. Třeň je štíhlá, 8 – 15 cm dlouhá bílé barvy. V horní části je bělavý prsten. Od shora dolů se třeň mírně rozšiřuje až ve vejčitou spodinu ohraničenou tupým límečkem. Nad límečkem bývá jeden až dva úzké kroužky. Výtrusy mají vejčitý tvar (19).

Muchomůrka tygrovaná roste především v teplejších oblastech. Zpravidla roste ve smíšených a listnatých lesích, jako průvodní dřeviny jsou nejčastěji udávány dub, smrk, habr a borovice. Roste především od června do konce první dekády v listopadu, přičemž maximum výskytu je během července a srpna (22).



Muchomůrka slámožlutá – *Amanita gemnata*

Klobouk je polokulovitý, pak sklenutý až plochý, slámově žlutý až světle okrový, často s řídkými bělavými útržky plachetky. Lupeny jsou však bílé. Prsten a jemná pochva zcela mizí. Třeň je válcovitá, bílá, hladká, ukončená drobnou kulovitou

hlízou obalenou křehkou, nízkou, mizivou pochvou. Na třeni je opět bílý, chabý až pavučinovitý, mizivý prsten. Dužina je bílá, nevýrazné chutě s vůní lehce ředkvovou (19).

Roste v červnu až říjnu v lesích všech typů a zvláště v písčitéch borech (21).



3.5. Toxiny odpovědné za psychotropní efekt

3.5.1. Kyselina ibotenová a muscimol

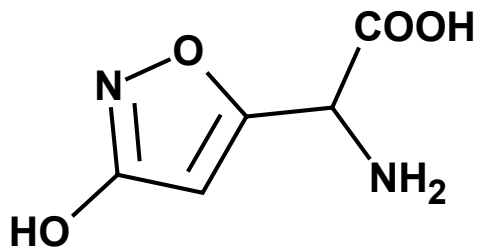
Kyselina ibotenová (obrázek 1), α -amino-3-hydroxy-5-izoxazoloctová kyselina $C_5H_6N_2O_4$, je bezbarvá, krystalická látka snadno rozpustná ve vodě, o molekulové hmotnosti M_R 158. Teplem se dekarboxyluje na muscimol. Muscimol (obrázek 2), 5-(aminomethyl)-3-hydroxyisoxazol $C_4H_6N_2O_2$, je rovněž bezbarvá krystalická látka, dobře rozpustná ve vodě, o molekulové hmotnosti M_R 114. Tyto látky byly v polovině 60. let izolovány z muchomůrky červené téměř současně několika výzkumnými týmy (Eugster a kol, Takemoto a kol). Posléze byly tyto látky zjištěny i u muchomůrky tygrováné (23, 24).

Kyselina ibotenová je konformační limitovaný derivát kyseliny glutamové a muscimol kyseliny γ -aminomáselné (GABA). Muscimol je silný GABA agonista a působí v CNS: snižuje množství cGMP aktivací γ Abu receptorů. To způsobuje v malých dávkách snížení motorické aktivity a je příčinou ataxie ve vyšších dávkách (24 – 26). Obě látky vyvolávají halucinace, delirium, svalový spasmus: působí jako falešné neurotransmitery (1 - 7). Aktivita kyseliny ibotenové je ovšem zhruba pětikrát nižší než muscimolu (27).

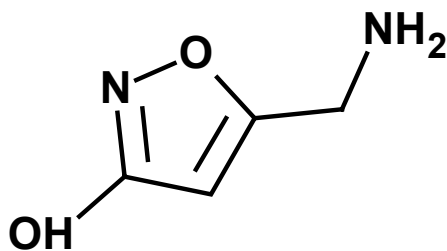
Práh projevu efektu na CNS u člověka je 6 mg muscimolu nebo 30-60 mg kyseliny ibotenové. Tento obsah může vykazovat jeden exemplář muchomůrky tygrováné nebo červené. Obě látky se vylučují v nezměněné podobě močí, kyselina ibotenová zhruba do 90 minut od požití houby a muscimol zřejmě do 6 hodin (2).

Kyselina ibotenová: LD50 129 mg.kg⁻¹ (p.o.) potkan, 42 mg (i.v.)

Muscimol: LD50 45 mg.kg⁻¹ (p.o.) potkan



Obr. 1: Struktura kyseliny ibotenové.

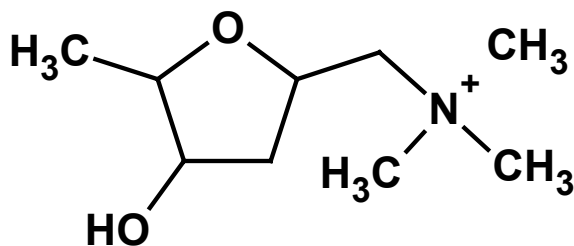


Obr. 2: Struktura muscimolu.

3.5.2. Muskarin

Muskarin (obrázek 3), který byl jako první houbový toxin izolován v roce 1869 z muchomůrky červené, byl dlouhá léta považován za hlavní aktivní látku této houby. Existuje ve formě solí (především chloridů) jako bílá krystalická látka, dobře rozpustná ve vodě, o molekulové hmotnosti M_R 174 (23). Tato látka byla rovněž prokázána v dalších druzích hub (17, 18). Muskarin působí na tu část periferního nervového systému, který využívá Ach jako mediátoru na postgangliovém zakončení parasymptických vláken. Jeho molekula má všechny základní strukturní prvky nutné pro vazbu přirozeného mediátoru na jeho receptor, navíc nepodléhá rychlému rozkladu acetylcholin-esterázou jako Ach a tím je jeho efekt dlouhodobější. Cholinergní receptory aktivované muskarinem jsou označovány jako muskarinové a představují postganglionické parasymptické receptory hladkého svalstva, srdce a žláz (8). Ze čtyř diastereomerů je nejúčinnější L-(+)-muskarin označovaný jako přírodní, který má tisíckrát větší účinnost než (-)-formy a 2,5 krát větší účinek než vlastní Ach (2, 28, 29). Muskarin se vylučuje močí v nezměněné podobě (2).

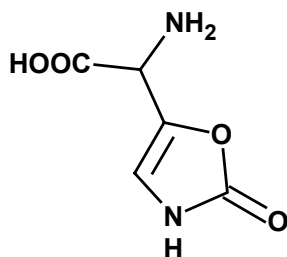
Muskarin: LD50 0,23 mg.kg⁻¹ (i.v.) myš



Obr. 3: Struktura muskarinu.

3.5.3. Muskazon

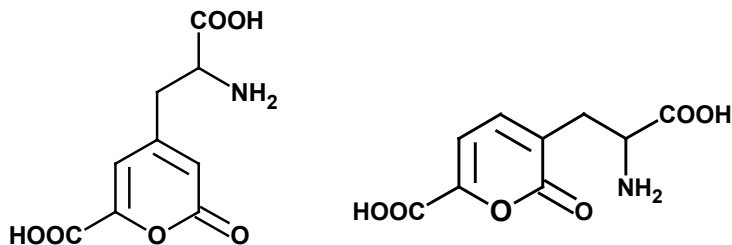
Muskazon (obrázek 4), α -amino-2,3-dihydro-2-oxo-5-oxazoleoctová kyselina, je bezbarvá krystalická látka, o molekulové hmotnosti M_R 158. Poprvé byl izolován v roce 1965 z muchomůrky červené Eugsterem, Mullerem a Goodem (23, 30). V porovnání s kyselinou ibotenovou a muscimolem má minoritní farmakologické účinky.



Obr. 4: Struktura muskazonu.

3.5.4. Kyseliny stizolobová a stizolobinová (obrázek 5)

Tyto deriváty L-DOPA objevené v muchomůrce tygrováné mají dosud neobjasněný účinek na CNS (31, 32).



Obr. 5: Struktura kyseliny stizolobové a kyseliny stizolobinové.

Kromě výše popsaných látek můžeme v těchto houbách nalézt ještě cholin, acetylcholin a rovněž tropanové alkaloidy atropin, skopolamin a bufotenin, které jsou ovšem v těchto houbách zastoupeny ve velmi malém množství (33 – 36).

3.6. Popis halucinogenních účinků hub z rodu *Amanita* z pozice intoxikovaného

V posledních letech stoupá počet především mladých lidí, kteří úmyslně experimentují s psychotropními druhy hub pro navození halucinogenních stavů. Pro ilustraci je zde uvedeno několik popisů halucinogenních stavů po požití muchomůrky červené.

„Pro experimenty jsem používal výhradně výluh z celých sušených plodnic. Nikdy jsem nepoužil víc než dvě houby najednou. Pokaždé jsem vypil všechno, co jsem z hub vyždímal a výsledek byl pokaždé jiný.

Zážitek první: Tenkrát jsem přebýval ve stavební boudě. Za každou hranou či kontrastním přechodem byl zřetelný, jakoby plastický zákmit, zdůrazňující detaily. Barevné podání bylo omezené, sytost snížena postupně až k téměř černobílému vidění. Slyšení bylo též jiné; jako když se zvukový signál prožene hřebenovým filtrem, zdůrazňujícím některé frekvence a potlačujícím jiné; výsledný dojem byl výrazné zostření sluchu díky odfiltrování šumů. Zažíval jsem pocit nespoutané letících myšlenek a jejich útržků, které se daly libovolně zachytávat a volně spojovat do nejfantastičtějších, úžasných barevných koláží, které jsem nechával odplývat do nicoty. V celém těle jsem pociťoval úžasný příliv energie. Vnímál jsem chvějivé napětí svých svalů a nepotlačitelnou tužbu po aktivitě. Nejspíš už ve chvíli kdy jsem odpadal, propadal jsem se do hlubokého, blaženého spánku; ale i v těchto chvílích nějaká má část bděla a hlídala můj dech, protože ten se občas zastavoval a já se musil nutit, abych zase dýchat začal a neutopil se v divoké rozkoši nedýchání. Poté, co jsem se sám se sebou popral, jsem se zase pohroužil do onoho podivného, hlubokého, přesto však živého, rozpolceného spánku. Druhý den jsem se probudil za světla, smrtelně unaven, přitom ale veškerá únava byla vnímána velmi přívětivě. Hlava mě kupodivu nebolela, jen jsem

pocitoval vlčí hlad; zároveň ale i nesmírnou malátnost, absolutní lenost, znemožňující mi vstát.

Zážitek druhý: Plodnice byla malá, ještě mládě ne větší než seschlá půlka citronu, takže jsem od ní nic moc nečekal. Pouhou čtvrt hodinu poté jsem své mínění ale musel radikálně změnit. Změněné vidění i slyšení se ohlásilo s velikou intenzitou, ale ten dojem byl překryt jiným, mnohem silnějším; veškeré plochy vůkol začaly být zborcené do neuvěřitelných tvarů - přitom hrany a obrysy byly nedotčené. Některé plochy se začaly vychlipovat proti mně v podobě jakýchsi chobotů a chapadel, jemně mě ohmatávajících. Přestože tento pocit byl přímo hmatatelný, celou dobu jsem věděl, že jsou to jen pouhé představy. S nejvyšším vypětím jsem se zkoncentroval natolik, abych došel domů. Zjistil jsem, že mi ale začalo být neuvěřitelně vedro. Měl jsem pocit, že shořím. Chvilí jsem se snažil nasadit kliku do dveří, abych mohl vpustit chlad zvenčí, ale nevedlo se mi to. Okno otevřít nešlo a chvilí jsem tak zápasil s neodolatelnou tužbou rozbít je. Venku začalo pršet a provazy vody na skle mě od toho odradily. Veškeré hmatové pocity byly neuvěřitelně intenzivní, ostré až k bolestivosti, ale velice příjemné a uklidňující. Tiskl jsem se k podlaze a pozoroval úžasné hemžení vody na skle okna. Hučení větru zvenčí se zvolna transformovalo do majestátního zvuku varhan a meluzína v kamnech v mohutný sbor plnicí místnost dunivým oratoriem. Ten zvuk pronikal vše kolem. Na okně jsem přitom mohl sledovat neuvěřitelné výjevy, které ten zvuk vyvolával; výjevy ne zcela srozumitelné, ale čím dál tím naléhavější a hrozivější. Náhle jsem vprostřed okenní tabulky zahlédl - ne, spíš vycítil cosi strašného. Jeden z těch provázků vody, stékající po skle, náhle skrz neporušené sklo pronikl dovnitř a začal se prodlužovat směrem ke mně. Bližil se ke mně nesmírně zvolna, ale s děsivou neúprosností. Nechápal jsem, co se děje, současně jsem věděl, že je to jen má fantazie, a přitom jsem s mrazivou přesností věděl, co se stane. Ten provázek spletený z vody se bližil jako nějaké chapadlo, možná liána, zvolna, nezadržitelně. Dotkl se mě v jediném mrazivém bodě a veškeré mé tělesné pocity se od té chvíle soustředily do toho jediného bodu. Dotkl se mé dlaně a v tom místě jsem ztratil cit. Ten hrot zvolna klouzal po mé paži, nechávaje tam stále se šířící pásmo ztráty jakéhokoliv citu. Přejel zvolna přes mou hrud' a mé srdce jakoby sevřela mrazivá ruka. Jeho zrychlené bušení jsem vnímal v celém těle. To bušení teď naplňovalo vše kolem duněním, před kterým nebylo úniku.

Ten mrazivý hrot zatím zvolna, beze spěchu stoupal až k mému krku a tam se na okamžik zastavil. Od této chvíle přestal působit necitlivost. Velmi zvolna se mi začal ovíjet kolem krku, cítil jsem, jak pomalinku postupuje, jako by se mi kolem krku ovíjel had, pomalu, neúprosně. Ten studený had se v té chvíli začal beze spěchu, ale nezvratně stahovat kolem mého krku. Začal jsem se bezmocně, zoufale dusit. V jednom okamžiku, který jsem nepostřehl, protože byl překryt beznadějným zoufalstvím, jsem shledal, že stojím. Stál jsem u ponku, ležérně se opíral o svěrák, a hleděl sám na sebe, jak tam ležím, ten had obtočen kolem mého krku, a s překvapením a zvědavostí pozoroval, jak se mé tělo začíná vzpínat v marném zápase o dech. Bylo to něco naprosto šíleného. Já tam stál a díval se na své tělo, vzpínající se přede mnou na holé betonové podlaze, na jeho ruce, marně se snažící servat ten rdousící proužek, omotaný kolem jeho krku. Viděl jsem, jak se ten provázek dešťové vody napíná a jak se skleněná tabulka prohýbá a vychlipuje pod jeho tahem, jako by byla gumová. Viděl jsem vytřeštěné oči a ruce, které křeč zkroutila jako pařáty. Pozoroval jsem to tělo, zachvácené křečí agonie, kroutící je do vrtule. Věděl jsem, že jediným pohybem mohu přerazit ten deštný provázek, co je rdousil, protože je přece křehký jako sklo, ale na druhé straně jsem byl zaujat nesmírnou zvědavostí, fascinací, která mě nutila dále sledovat to zvláštní divadlo přede mnou. Viděl jsem, jak se to tělo přede mnou prudce praštilo o hranu povaleného stolu a tak jsem pod něj kopnul montérky, válející se vedle, aby sebou v smrtelné křeči nemlátilo o tvrdý beton podlahy. Náhle jsem viděl, jak se v posledním zoufalém vzepjetí propíná do oblouku. Téměř mimovolným, ledabylým máchnutím jsem přerazil ten tenký rdousící paprsek vody a vzápětí jsem věděl, že je to pozdě. Že právě v téhle chvíli jsem všechno zpackal. Protože teď jsem já byl tím vzpínajícím se tělem a spolu s ním jsem se propadal do nekonečnosti.“ (37)

3.7. Analytické metody použité k identifikaci, popř. stanovení kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu z hub rodu *Amanita*

V literatuře můžeme nalézt několik prací zabývajících se izolací a průkazem, popř. stanovením kyseliny ibotenové a muscimolu z houbového materiálu. Je popsán průkaz a stanovení těchto látek různými chromatografickými postupy (např. metoda TLC, GC či HPLC). Článků popisujících izolaci a průkaz, popř. stanovení muskarinu je o poznání méně a většina z nich je datována do druhé poloviny 20. století, kdy nastal „boom“ ve výzkumu muchomůrky červené a tygrované. Vzhledem k polárnímu charakteru látek se jako nejvhodnější metoda k průkazu, popř. stanovení daných látek jeví kapalinová chromatografie. V posledních letech dochází k rozmachu v použití hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií. Vzhledem k vysoké citlivosti MS, toto spojení umožňuje detekovat velmi malá množství látek z různých matric. Může se použít i plynová chromatografie s hmotnostní detekcí, látky se ovšem musí před samotnou analýzou upravit, aby klesla jejich polarita. Nabízí se látky derivatizovat, což ovšem znamená zvýšení doby přípravy vzorku.

Tenkovrstvá chromatografie

V roce 1966 použil Benedict a kol (38) dvou-dimenzionální papírovou chromatografií k izolaci a průkazu kyseliny ibotenové a muscimolu v různých druzích hub rodu *Amanita*. Jako vyvíjecí soustava 1 byla použita směs *n*-butanol/octová kyselina/voda 1/1/1, jako vyvíjecí soustava 2 byla použita směs butanol/pyridin/voda 1/1/1 v/v. Látky dávaly pozitivní barevnou reakci s ninhydrinem. Toxiny byly detekovány v muchomůrce červené, muchomůrce tygrované a muchomůrce slámožluté.

Stijve (39) izoloval a identifikoval muscimol a muskarin v muchomůrce červené a tygrované a rovněž našel muskarin v několika druzích hub z rodu strmělek a vlákníc a v helmovce ředkvičkovité. Izolace sledovaných látek z hub byla provedena metodou extrakce kapalina-kapalina. K identifikaci použil vysokoúčinnou tenkovrstvou chromatografií (HPTLC silicagel 60 F254). Vyvíjecí soustava pro muscimol byla složena z 2-butanol/ethanol 95 %/octová kyselina 100 %/voda 75:25:5:25 v/v a pro

muskarin byla jako vyvíjecí soustava použita směs 2-butanol/ethanol 95 %/ octová kyselina 100 %/voda 80:20:10:30 v/v. Zatímco muscimol dával pozitivní reakci s ninhydrinem, muskarin byl detekován modifikovaným Dragendorffovým činidlem. Vizuálním zhodnocením bylo odhadnuto, že se v muchomůrce červené nachází 1900 mg/kg d.w. muscimolu, respektive 3000 mg/kg d.w. v muchomůrce tygrované. Oproti tomu, odhadnuté množství muskarinu bylo několiknásobně nižší – 90 mg/kg d.w. v muchomůrce červené a 5 mg/kg d.w. v muchomůrce tygrované. Na druhou stranu v některých houbách rodu *Inocybe* a *Clitocybe* bylo zjištěno až stonásobně vyšší množství muskarinu, než je tomu u rodu *Amanita* (17, 18).

Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Lund (40) v roce 1979 použil pro stanovení kyseliny ibotenové a muscimolu v muchomůrce červené HPLC s UV detekcí. Pro kyselinu ibotenovou použil dvě chromatografické kolony spojené za sebou – LiChrosorb-NH2 10 µm a Nucleosil 5CN, jako mobilní fázi použil 0,05 mol/l pufr octanu sodného o pH 4,0. Muscimol byl separován na koloně Li-Chrosorb-NH2 10 µm s 0,05 mol/l pufrém octanu sodného o pH 4,0 ve směsi s metanolem 1/9 v/v jako mobilní fáze. Množství kyseliny ibotenové bylo 100 mg/kg a muscimolu méně než 3 mg/kg. Nicméně po úpravě vzorku kyselinou octovou se stanovilo 40 mg/kg muscimolu. Další metodu HPLC-UV popsal Komiyama a kol (41). Pro extrakci kyseliny ibotenové a muscimolu použil anion-výměnnou chromatografii. Obě látky byly separovány na koloně Shim-pack P NH2/S 2054. Látky byly detekovány při vlnové délce 220 nm. Limit detekce pro kyselinu ibotenovou byl 18 mg/kg a pro muscimol 10 mg/kg.

Gennaro a kol (42) vypracovali metodu pro analýzu kyseliny ibotenové a muscimolu z muchomůrky červené založenou na ion-párové chromatografii. Pro izolaci látek bylo vyzkoušeno několik extrakčních postupů. Jako první byla vyzkoušena extrakce na pevné fázi, kdy pro kyselinu ibotenovou použili anion-výměnnou chromatografii a pro muscimol SPE-C18. Dále zkoušeli extrakci kapalina-kapalina s různými druhy rozpouštědel (ethanol:voda, methanol:voda, ethanol:methanol:voda, chloroform, diethylether a hexan). Ve výsledku měly tyto postupy nízkou selektivitu

a uplatňoval se zde vysoký vliv matrice. V konečném postupu byl vzorek čerstvých hub pouze homogenizován a sonifikován. Vodná část byla filtrována přes nylonovou membránu a přímo injektována do HPLC systému. Stanovení kyseliny ibotenové a muscimolu bylo zvlášť provedeno v klobouku a tření houby na koloně Spherisorb S5 ODS-2 za použití vodného roztoku 5,0 mmol/l octylamonium *o*-fosfátu jako mobilní fáze. Látky byly detekovány při vlnových délkách 230 nm (maximum absorpance obou látek) a 254 nm. Limit detekce pro kyselinu ibotenovou byl 30 mg/l a pro muscimol 18 mg/l. V klobouku a tření houby byl nalezen muscimol v množství 380 mg/kg, respektive 80 mg/kg a kyselina ibotenová v množství 990 mg/kg, respektive 230 mg/kg. Další metodou HPLC založenou na použití ion-párového činidla publikovali Tsunoda a kol (43). Po extrakci homogenizátu muchomůrky červené 70 % methanolem a následné filtraci vzorky analyzovali na koloně IRICA RP-18, kdy byl do mobilní fáze složené z voda/acetonitril/methanol 65/20/15 a 4 mmol/l kys. fosforečné přidán 2,1 mmol/l dodecylsulfát, pro zvýšení retence látek. Látky detekovali při vlnové délce 210 nm. Meze detekce obou látek byly kolem 1 mg/kg. Koncentrace kyseliny ibotenové byla v rozmezí 18-27 mg/kg a muscimolu 258-471 mg/kg.

Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

Størmer a kol (44) stanovovali kyselinu ibotenovou ze spór a klobouku muchomůrky červené sbírané ve třech různých lokalitách. Ke stanovení použili LC-MS s ionizací elektrosprejem v pozitivním modu. Vodný extrakt houby okyselený kyselinou octovou byl přímo injektován na kolonu Xterra MS C18. Byla použita gradientová eluce, mobilní fáze 1 byla voda/methanol (19:1 v/v) a mobilní fáze 2 acetonitril/voda/methanol (18:1:1 v/v). Koncentrace kyseliny ibotenové ve spórách houby byla v rozmezí 47 - 61 mg/kg a v klobouku 78 - 260 mg/kg. Navíc bylo zjištěno, že se kyselina ibotenová v 96 % vyskytuje v enol-formě a pouze ve 4 % v keto-formě při pH v rozmezí 2-6. Tytéž výsledky získali použitím UV detekce při vlnové délce 254 nm za podmínek převzatých od Tsunoda a kol (43). Další metodu popsal Tsujikawa a kol (45), kdy stanovovali obsah kyseliny ibotenové a muscimolu v klobouku a tření

muchomůrky červené. 50 mg prášku houby smíchali s 2 ml směsí methanol/voda 7/3 v/v. Směs sonifikovali po dobu 5 minut a po centrifugaci oddělili supernatant. 100 μ l supernatantu odpařili pod proudem dusíku do sucha. Odparek nejprve derivatizovali dansyl chloridem, reakce probíhala 90 minut při pokojové teplotě za vzniku produktů DNS-MUS a DNS-IBO. Následně byla provedena ethylace za vzniku DNS-IBO ethyl esteru. Vzorky byly analyzovány užitím kolony Symmetry C18 za použití 10 mmol/l octanu amonného ve směsi s acetonitrilem jako mobilní fáze, pro lepší separaci bylo použito gradientové eluce. Vzorky byly identifikovány tandemovou hmotnostní spektrometrií s elektrosprejem v kladném módu a iontovou pastí jako analyzátozem. Základní hmoty pro identifikaci látek byly m/z 347 pro DNS-MUS a m/z 419 pro DNS-IBO-Et. Analýza trvala 30 minut, přičemž retenční časy byly 24,4 min pro DNS-MUS, respektive 25,7 min pro DNS-IBO-Et. Rozsah kalibrační křivky se pohyboval v rozmezí 25-2500 mg/l. Nevýhodou této metody je dlouhá doba přípravy vzorků a rovněž délka analýzy.

Můžeme říci, že jedinou metodu, která stanovuje kyselinu ibotenovou, muscimol a muskarin současně publikovali Deveaux a kol (46). Opět byl analyzován vzorek sušených plodnic muchomůrky červené. Přefiltrovaný vodný extrakt byl rovnou aplikován na kolonu s reverzní fází C18. Mobilní fáze byla složená z 2 mmol/l mravenčanu amonného (pH 3) a acetonitrilu a byla použita gradientová eluce. I zde byl použit elektrosprej v kladném módu a jako analyzátor trojitý kvadrupól. Hodnoty m/z byly 174,2 pro muskarin, 115,1 pro muscimol a 159,0 pro kyselinu ibotenovou. Množství analytů v klobouku (tření) činilo pro kyselinu ibotenovou 97,2 (16,4) mg/l, muscimol 96 (3,6) mg/l a muskarin 2006 (39,7) mg/l. Meze detekce byly 10 mg/l pro kyselinu ibotenovou a 2 mg/l pro muscimol a muskarin.

Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

V současnosti není publikováno příliš mnoho prací zabývajících se průkazem výše zmíněných analytů plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Problémem je zřejmě v nalezení vhodné úpravy analytů, která by vedla ke snížení jejich vysoké polaridy. Publikované derivatizační postupy navíc vedou ke zvýšení doby analýzy

vzorků, což je nevýhodou, pokud se má v co nejkratším čase zjistit příčina intoxikace při podezření na otravu houbami a zahájit vhodná léčba.

Repke a kol (47) popisuje izolaci a průkaz muscimolu a kyseliny ibotenové v muchomůrce tygrované. Klobouk houby nechal 8 hodin extrahovat 10 % vodným roztokem methanolu. Z filtrátu odebral množství 0,5 ml, které použil k dalšímu postupu. Tento roztok nechal po dobu 30 min při 140 °C reagovat s bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem. Poté tento roztok přímo analyzoval na GLC/MS typu kvadrupól.

Další GC/MS metodu popisuje Tsujikawa a kol (48), který opět stanovoval množství muscimolu a kyseliny ibotenové v muchomůrce tygrované a červené. 200 µl supernatantu, vzniklého po extrakci 50 mg houbového prášku 2 ml 70% methanolem, odpařil do sucha a odparek nechal reagovat s 50 µl BSTFA obsahující 10% TMCS a 50 µl ethylacetátu po dobu 30 min při 80°C. 1 µl tohoto roztoku poté přímo aplikoval na chromatografickou kolonu (DB5). Jako nosný plyn bylo použito hélium. Byla použita elektronová ionizace. Pro kvalitativní stanovení byla analýza provedena ve scan módu (m/z 40-450) a pro kvantifikaci látek bylo použito SIM módu - m/z 257 pro kyselinu ibotenovou a m/z 243 pro muscimol. Jako interní standard byl použit *n*-pentadekan, m/z 57. Touto metodou se mu podařilo stanovit muscimol (46-1052 mg/kg) a kyselinu ibotenovou (10-2845 mg/kg) v 5 různých kloboucích muchomůrky červené. Ve dvou různých kloboucích muchomůrky tygrované rovněž stanovil muscimol (1554-1880 mg/kg) a kyselinu ibotenovou (188-269 mg/kg).

3.8. Analytické metody použité k analýze kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu z moče

Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

Stříbrný a kol (49) popsal metodu založenou na izolaci kyseliny ibotenové a muscimolu z moče pomocí slabého katexu. Eluát je odpařen do sucha a odparek je rozpuštěn ve směsi dichlormethanu a ethylchloromravenčanu, který představuje derivatizační činidlo. Stanovení se provádí na GC/MS, kolona HP-5MS UI., m/z 186 pro muscimol-ECF a m/z 258 pro kyselinu ibotenovou-ECF.

3.9. Toxikologické vyšetření a odběr biologického materiálu

Základním předpokladem zdařilého toxikologického vyšetření je správná volba vhodných biologických vzorků k analýzám, a to v dostatečném množství vzhledem k řešenému problému. Množství biologického vzorku by mělo být dostatečné, aby bylo možno analýzu opakovat. Vzorek musí být uchován od odběru až do doby analýzy tak, aby se minimalizoval případný rozklad labilních analytů.

Při podezření na otravu jsou u živých osob k analýze nejčastěji odebírány moč, krev a žaludeční obsah. Kvantifikace zjištěných tox v krvi v kontextu s klinickým stavem pacienta napomáhá posoudit závažnost otravy.

4. Experimentální část

4.1. Biologický materiál

Vzorky moče byly získány od pacientů vyšetřovaných na Ústavech soudního lékařství fakultních nemocnic v Olomouci a Ostravě.

4.2. Chemikálie

Kyselina ibotenová monohydrát, muscimol a muskarin hydrochlorid byly zakoupeny od firmy Sigma a Fluka (St. Louis, USA).

Voda gradient grade pro HPLC byla vyrobena purifikačním systémem Aqual (Brno, ČR) na Ústavu soudního lékařství Ostrava.

Methanol gradient grade pro HPLC, acetonitril gradient grade pro HPLC, kyselina mravenčí pro LC/MS, kyselina octová pro LC/MS a sodiumdodecylsulfát byly zakoupeny od firmy Sigma (St. Louis, USA).

Mravenčan amonný pro LC/MS, triethylamin p.a., trifluorooctová kyselina pro LC/MS, kyselina heptafluoromáselná p.a. a hydrogenuhličitan amonný pro LC/MS byly zakoupeny od firmy Fluka (St. Louis, USA).

Octan amonný (fraktopur), pyridin p.a. a dihydrogenfosforečnan draselný p.a. byly zakoupeny u firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Diethylether p.a. nestabilizovaný, toluen p.a., chloroform p.a., *n*-hexan p.a., ethylacetát p.a., kyselina chlorovodíková konc., aceton p.a., dichlormethan p.a., amoniak (25 % vodný roztok) p.a. a kyselina fosforečná p.a. byly zakoupeny od firmy Penta (Chrudim, ČR).

Hydroxid sodný p.a. byl zakoupen u firmy Jan Kulich (Hradec Králové, ČR).

Acetátový pufr (pH 4,5), fosfátový pufr (pH 7) a uhličitanový pufr (pH 10) byly vyrobeny v toxikologické laboratoři Ústavu soudního lékařství Ostrava.

Acetylovaný muskarin byl vyroben na Katedře organické chemie, PřF UP Olomouc, následujícím postupem: muskarin hydrochlorid (10 mg, 0,047 mmol) byl rozpuštěn ve směsi kyseliny octové (800 μ l), anhydridu kyseliny octové (100 μ l) a pyridinu (100 μ l). Reakční směs byla 20 hodin míchána při laboratorní teplotě. Po ukončení reakce byla reakční směs zahuštěna do sucha na vakuové rotační odparce a zbylý materiál byl dále třikrát odpařen s toluenem. Získaný produkt byl přes noc sušen při 51 °C ve vakuové sušárně. Surový acetylmuskarin vysoké čistoty byl získán jako bezbarvá olejovitá látka, MS $[M+H]^+$ při m/z 216.2, ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.20 (d, J = 6.59 Hz, 3H) 1.87 – 2.15 (m, 2H) 2.04 (s, 3H) 3.12 (s, 9H) 3.37 – 3.50 (m, 1H) 3.55 – 3.68 (m, 1H) 3.93 – 4.07 (m, 1H) 4.41 – 4.57 (m, 1H) 4.75 – 4.88 (m, 1H). NMR ^1H experiment byl měřen na přístroji Varian Unity Plus (299.89 MHz, ^1H) za laboratorní teploty (21°C) v DMSO- d_6 roztoku. Chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm (vztaženo k referenčnímu signálu DMSO) a interakční konstanty J v Hz.

4.3. Ostatní materiál

SPE kolonky Strata-X, Strata X-CW, Strata Screen A, Strata NH₂, Strata X-CN a Strata Screen C byly zakoupeny od firmy Phenomenex (Torrance, USA).

SPE kolonky Discovery WCX, Discovery MCAX, Discovery SCX a HybridSPE – Precipitation byly zakoupeny od firmy Supelco (St. Louis, USA).

Analytické kolony: Gemini C18 (50 $\times$ 2.0 mm i.d., 5 μ m), Synergi Fusion RP 80 (150 $\times$ 2.0 mm i.d., 4 μ m) a Gemini C18 (150 $\times$ 2.0 mm i.d., 5 μ m) byly zakoupeny od firmy Phenomenex (Torrance, USA).

4.4. Příprava zásobních roztoků standardů

Vodné zásobní roztoky kyseliny ibotenové, muscimolu, muskarinu a acetylovaného muskarinu byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml. Postupným ředěním zásobních roztoků byly připraveny pracovní roztoky požadovaných koncentrací.

4. 5. Použitá instrumentace

Analýzy byly provedeny na přístroji LC/MS firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko). Systém se skládá ze dvou pump LC-10AC, degaseru DGU-14A, autosampleru SIL-HT, kolonového termostatu CTO-10AC a hmotnostního spektrometru LC-MS2010A (kvadrupól s ionizací za atmosférického tlaku - ESI a APCI). Měření byla prováděna ve scan módu, kdy studované látky byly identifikovány na základě svých hmotnostních spekter a také v SIM módu, kdy studované látky byly identifikovány na základě svých retenčních časů.

Fragmentační spektra kyseliny ibotenové, muscimolu, muskarinu a acetylovaného muskarinu byla naměřena hmotnostním spektrometrem LCQ Fleet firmy Thermo Scientific (Waltham, USA). Jako ionizační zdroj byl použit elektrosprej. Přístroj vybavený iontovou pastí využívá hélium jako kolizní plyn a dusík jako zmlžující plyn.

4. 6. Volba iontového zdroje

Chemická ionizace za atmosférického tlaku a ionizace elektrosprejem byla studována v kladném a záporném módu. Měření probíhala na hmotnostním spektrometru s kvadrupólovým systémem. Pro tyto experimenty byly použity vodné roztoky standardů o následujících koncentracích: kyselina ibotenová a muscimol o koncentraci 2 µg/ml a muskarin o koncentraci 0,2 µg/ml. Experimenty byly provedeny v tripletech.

V kladném módu byly pro oba typy ionizace sledovány ionty uvedené v tabulce 1:

Analyt	m/z	Fragment
Kyselina ibotenová	159	$[M+H]^+$
Muscimol	115	$[M+H]^+$
	98	$[M-NH_3]^+$
Muskarin	174	$[M]^+$

Tab. 1: Přehled sledovaných iontů studovaných látek v kladném módu.

V záporném módu byly pro oba typy ionizace sledovány ionty uvedené v tabulce 2:

Analyt	m/z	Fragment
Kyselina ibotenová	157	$[M-H]^-$
Muscimol	113	$[M-H]^-$
	97	$[M-NH_3]^-$

Tab. 2: Přehled sledovaných iontů studovaných látek v záporném módu.

Měření pomocí APCI v kladném módu probíhalo za podmínek uvedených v tabulce 3:

Napětí kapiláry APCI	4,5 kV
Teplota kapiláry APCI	350 °C
Teplota na CDL	250 °C
Napětí na CDL	-25 V
Teplota na Block heateru	200 °C
Průtok sušícího plynu	1,5 l/min

Tab. 3: Použité parametry iontového zdroje a iontové optiky pro APCI+.

Měření pomocí APCI v záporném módu probíhalo za podmínek uvedených v tabulce 4:

Napětí kapiláry APCI	-3,5 kV
Teplota kapiláry APCI	350 °C
Teplota na CDL	200 °C
Napětí na CDL	20 V
Teplota na Block heateru	250 °C
Průtok sušícího plynu	1,5 l/min

Tab. 4: Použité parametry iontového zdroje a iontové optiky pro APCI-.

Měření pomocí ESI v kladném módu probíhalo za podmínek uvedených v tabulce 5:

Napětí kapiláry ESI	4,5 kV
Teplota na CDL	250 °C
Napětí na CDL	-20 V
Teplota na Block heateru	200 °C
Průtok sušícího plynu	1,5 l/min

Tab. 5: Použité parametry iontového zdroje a iontové optiky pro ESI+.

Měření pomocí ESI v záporném módu probíhalo za podmínek uvedených v tabulce 6:

Napětí kapiláry ESI	-3,5 kV
Teplota na CDL	200 °C
Napětí na CDL	20 V
Teplota na Block heateru	200 °C
Průtok sušícího plynu	1,5 l/min

Tab. 6: Použité parametry iontového zdroje a iontové optiky pro ESI-.

4. 7. Nalezení vhodných parametrů MS (kvadrupól)

Nevhodně zvolenými parametry může dojít buď ke špatné ionizaci látek nebo k rozkladu studovaných analytů. Pro dosažení nejlepší ionizace látek byly testovány tyto parametry přístroje:

- Napětí na kapiláře ESI
- Teplota a napětí na CDL
- Teplota na Block heateru

Pro experimenty byly použity vodné roztoky standardů kyseliny ibotenové a muscimolu o koncentraci 2 µg/ml a muskarinu o koncentraci 0,2 µg/ml. Byla testována závislost odezev jednotlivých standardů na daných parametrech. Experimenty byly provedeny v tripletech.

4. 8. Určení podmínek LC

Pro nalezení vhodných podmínek separace jednotlivých analytů bylo testováno několik analytických kolon a mobilních fází. Pro tyto experimenty byly použity vodné roztoky standardů kyseliny ibotenové a muscimolu o koncentraci 2 µg/ml a muskarinu o koncentraci 0,2 µg/ml. Experimenty byly provedeny v tripletech.

Kolona Gemini C18 (50 × 2.0 mm i.d., 5 µm)

Použité mobilní fáze:

- 100 mmol/l vodný roztok octanu amonného s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí a acetonitril (analýza byla prováděna isokraticky - 35 % ACN i gradientovou elucí: 0 → 15 min: 15 → 90 % ACN, 15 → 17 min: 90 → 15 % ACN).

- 0,1 % vodný roztok hydroxidu amonného a acetonitril (analýza byla provedena isokraticky -
35 % ACN i gradientovou elucí: 0 → 15 min: 15 → 90 % ACN, 15 → 17 min: 90 → 15 % ACN).
- 0,1 % vodný roztok triethylaminu s přídavkem 0,1% kyseliny octové a acetonitril (analýza byla prováděna isokraticky -35 % ACN i gradientovou elucí: 0 → 15 min: 15 → 90 % ACN, 15 → 17 min: 90 → 15 % ACN)
- 0,1 % vodný roztok kyseliny trifluoroctové a acetonitril (analýza byla prováděna isokraticky - 35 % ACN i gradientovou elucí: 0 → 15 min: 15 → 90 % ACN, 15 → 17 min: 90 → 15 % ACN).

Kolona Synergi Fusion RP 80 (150 × 2.0 mm i.d., 4 μm)

Použitá mobilní fáze:

- 0,1 % vodný roztok hydroxidu amonného a acetonitril (analýza byla prováděna isokraticky - 35 % ACN i gradientovou elucí: 0 → 15 min: 15 → 90 % ACN, 15 → 17 min: 90 → 15 % ACN).
- 0,1 % vodný roztok kyseliny trifluoroctové a acetonitril (analýza byla prováděna isokraticky -35 % ACN i gradientovou elucí: 0 → 15 min: 15 → 90 % ACN, 15 → 17 min: 90 → 15 % ACN).
- 2 mmol/l vodný roztok mravenčanu amonného upraven kyselinou mravenčí (pH 3,5) a acetonitril (analýza byla prováděna isokraticky - 35 % ACN i gradientovou elucí: 0 → 15 min: 15 → 90 % ACN, 15 → 17 min: 90 → 15 % ACN).
- 0,1 % vodný roztok kyseliny mravenčí a acetonitril (analýza byla prováděna isokraticky - 35 % ACN i gradientovou elucí: 0 → 15 min: 15 → 90 % ACN, 15 → 17 min: 90 → 15 % ACN).
- 1 mmol/l vodný roztok heptafluoromáselné kyseliny a 0,1 % kyselina mravenčí v metanolu (isokratická eluce 50 % : 50 %)

Kolona Gemini C18 (150 × 2.0 mm i.d., 5 µm)

Použité mobilní fáze:

- 1 mmol/l vodný roztok kyseliny heptafluoromáselné
- 3 mmol/l vodný roztok kyseliny heptafluoromáselné
- 5 mmol/l vodný roztok kyseliny heptafluoromáselné
- 7 mmol/l vodný roztok kyseliny heptafluoromáselné
- 8 mmol/l vodný roztok kyseliny heptafluoromáselné
- 9 mmol/l vodný roztok kyseliny heptafluoromáselné
- 8 mmol/l vodný roztok kyseliny heptafluoromáselné a acetonitril (analýza byla prováděna isokraticky (postupně 2, 6, 8 % ACN) i gradientovou elucí: 0 → 6 min: 0 % ACN, 6,01 → 25 min: postupně 5, 8 a 12 % ACN).
- 8 mmol/l vodný roztok kyseliny heptafluoromáselné a methanol (analýza byla prováděna isokraticky (postupně 2, 6, 8 % methanolu) i gradientovou elucí: 0 → 6 min: 0 % methanolu, 6,01 → 25 min: postupně 5, 8 a 12 % methanolu).

4. 9. Měření fragmentačních spekter

Fragmentace kyseliny ibotenové, muscimolu, muskarinu a acetylovaného muskarinu byly studovány na přístroji MS s iontovou pastí. Nejprve byla testována závislost odezvy studovaných látek na níže uvedených parametrech přístroje, aby byly zajištěny neoptimálnější podmínky pro jejich analýzu.

- Napětí kapiláry ESI
- Teplota vyhřívání kapiláry
- Napětí na vyhřívání kapiláry

Analyty byly aplikovány přímo na detektor, měření byla provedena v tripletech. K měření byly použity roztoky standardů kyseliny ibotenové, muscimolu, muskarinu a acetylovaného muskarinu o koncentraci 10 µg/ml, rozpuštěné v mobilní fázi.

Průtoková rychlost vzorků byla 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Fragmentace byla měřena při ionizaci elektrosprejem v kladném módu.

4. 10. Izolační metody

4. 10. 1. Extrakce kapalina-kapalina (LLE)

Negativní vzorek moče o objemu 0,5 ml a vzorek moče o objemu 0,5 ml, spikovaný standardy kyseliny ibotenové a muscimolu na koncentraci $c = 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ a muskarinu na koncentraci $2 \mu\text{g}/\text{ml}$, byly extrahovány do 2 ml etheru. Následně byly vzorky podrobeny acidobazické extrakci při pH 3 - 4 a pH 8 - 9 do 2 ml etheru. Etherické extrakty byly za laboratorní teploty odpařeny do sucha v proudu dusíku. Odparky (extrakt moče bez úpravy pH, extrakt z kyselého prostředí a extrakt z bazického prostředí) byly rozpuštěny ve 100 μl vody a aplikovány na LC/MS. Stejný postup byl použit pro extrakci do ethylacetátu, směsi ether:ethylacetát 1:1, toluenu, *n*-hexanu a dichlormethanu. Všechny experimenty byly prováděny v dubletech.

4. 10. 2. Extrakce na pevné fázi (SPE)

Vzhledem k polárnímu charakteru studovaných látek byla pro jejich izolaci z moče testována extrakce na pevné fázi použitím řady extrakčních postupů na různých nosičích. Na základě fyzikálně-chemických vlastností zkoumaných látek byly testovány následující typy SPE kolonek (tabulka 7):

Sorbent	Mod	Analyt
Strata X	reverzní fáze	polární látky
Strata X-CW	slabý katex + reverzní fáze	kvarterní aminy, silné kationty
Strata Screen C	C8 + silný katex	bazické látky
Discovery WCX	slabý katex + reverzní fáze	kvarterní aminy, silné kationty
Discovery MCAX	katex + reverzní fáze	polární látky
Discovery SCX	silný katex	aminy
Strata Screen A	C8 + silný anex	kyselé látky
Strata SCX	silný katex	aminy
Strata NH2	slabý anex + hydrofóbní vazby	polární látky
Strata X-CN	selektivní pro polární látky	polární látky obsahující hydroxylovou nebo amino skupinu

Tab. 7: Přehled použitých SPE kolonek pro izolaci kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu z moče.

Strata X

Pro extrakci bylo použito 2 ml negativní moče spikované standardy kyseliny ibotenové a muscimolu na koncentraci 2 µg/ml a muskarinu na koncentraci 0,2 µg/ml. Pro extrakci byla použita moč o běžném pH (kolem 5,75), okyselená moč (pH 2,5) a moč upravená na pH 10.

Jako výchozí izolační postup pro kyselinu ibotenovou, muscimol a muskarin byl použit výrobcem doporučený postup extrakce. Ke kondicionaci kolonky bylo použito 2 ml methanolu, následováno 2 ml deionizované vody. Poté byla na kolonku aplikována moč spikovaná standardy sledovaných látek. Kolonka byla promyta 2 ml 30 % vodným roztokem methanolu. Po vysušení kolonky pod vakuem (1 min) byla provedena eluce 100 % methanolem.

Strata X-CW, Discovery WCX

Pro extrakci bylo použito 2 ml negativní moče spikované standardy kyseliny ibotenové a muscimolu na koncentraci 2 µg/ml a muskarinu na koncentraci 0,2 µg/ml. Pro extrakci byla použita moč o běžném pH (kolem 5,75) a okyselená moč (pH 2,5).

Ke kondicionaci kolonky bylo použito 2 ml methanolu, následováno 2 ml deionizované vody. Spikovaný vzorek moče byl okyselen 20 µl kyseliny fosforečné a aplikován na kolonku. Promytí bylo provedeno 2 ml acetátového pufru (pH 4,5). Po vysušení kolonky pod vakuem (1 min) následovala eluce 2 ml 5 % kyselinou mravenčí v methanolu.

Discovery SCX

Pro extrakci studovaných analytů z moče byl rovněž vyzkoušen silný katex. Pro extrakci bylo použito 2 ml negativní moče spikované standardy kyseliny ibotenové a muscimolu na koncentraci 2 µg/ml a muskarinu na koncentraci 0,2 µg/ml. Pro extrakci byla použita moč o běžném pH (kolem 5,75) a okyselená moč (pH 2,5).

Ke vzorku moče byly přidány 4 ml 0,5 % kyseliny mravenčí. SPE kolonka byla kondicionována 2 ml methanolu, následováno 2 ml 0,5 % kyselinou mravenčí (pH 2,5). Následovala aplikace vzorku (1 – 2 kapky za sekundu). Kolonka byla promyta 2 ml 0,1 M HCl. Po vysušení kolonky pod vakuem (1 min) byla provedena eluce 2 ml 7,5 % kyselinou mravenčí v methanolu.

Strata Screen A, Strata AW

Pro extrakci bylo použito 2 ml negativní moče spikované standardy kyseliny ibotenové a muscimolu na koncentraci 2 µg/ml a muskarinu na koncentraci 0,2 µg/ml. Pro extrakci byla použita moč o běžném pH (kolem 5,75) a moč upravena na pH 10.

Vzorek moče o objemu 2 ml byl smíchán s 2 ml uhličitánového pufru o pH 10. Kondicionace kolonky byla provedena methanolem, následováno 2 ml uhličitánového pufru pH 10. Po aplikaci vzorku (1 – 2 kapky za sekundu) byla kolonka promyta opět

2 ml uhličitanového pufru o pH 10. Po vysušení kolonky pod vakuem (1 min) byla provedena eluce 2 ml 1 % kyseliny chlorovodíkové v methanolu.

Další použité SPE kolonky

Byly rovněž testovány kolonky Strata X-CN, Strata NH₂, Discovery MCAX. Pro extrakce bylo použito 2 ml negativní moče spikované standardy kyseliny ibotenové a muscimolu na koncentraci 2 µg/ml a muskarinu na koncentraci 0,2 µg/ml. Pro extrakci byla použita moč o běžném pH (kolem 5,75) a moč s upravenou hodnotou pH.

Eluáty byly vždy odpařeny v proudu dusíku a rozpuštěny ve 100 µl deionizované vody. Extrakce na jednotlivých kolonkách byly prováděny v dubletech a vždy byla stejným postupem zpracována rovněž negativní moč.

Rovněž bylo započato s testováním kolonky HybridSPE – Precipitation. Na kolonku byla přímo aplikována směs 100 µl séra s 300 µl acetonitrilu okyseleného 1 % kyselinou mravenčí. Rovněž byla na kolonku aplikována směs 100 µl séra s 300 µl methanolu okyseleného 1 % kyselinou mravenčí. Sérum bylo spikováno ibotenovou kyselinou a muscimolem na koncentraci 2 µg/ml a muskarinu na koncentraci 0,2 µg/ml. Eluáty bylo přímo aplikovány na systém LC/MS.

4. 11. Validace metody pro stanovení muskarinu

4.11.1. Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

Analýzy byly provedeny na přístroji LC/MS firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko). Systém se skládá ze dvou pump LC-10AC, degaseru DGU-14A, autosampleru SIL-HT, kolonového termostatu CTO-10AC a hmotnostního spektrometru LC-MS2010A (kvadrupól s ionizací za atmosférického tlaku - ESI a APCI). Měření byla prováděna jednak ve scan módu, kdy studované látky byly identifikovány na základě svých hmotnostních spekter, a také v SIM módu, kdy studované látky byly identifikovány na základě svých retenčních časů.

4.11.2. Roztoky standardů

Zásobní vodný roztok standardu muskarinu byl připraven o koncentraci 1,0 mg/ml. Pracovní roztoky byly připraveny naředěním zásobního roztoku. Do každého roztoku muskarinu nebo vzorku moče o objemech 1 ml bylo přidáno 10 µl acetylovaného muskarinu o koncentraci 2,0 µg/ml jako interní standard. Zásobní a pracovní standardní roztoky byly uskladněny při -20 °C, za tmy. Vzorky pro měření přesnosti a správnosti metody byly připraveny naspikováním negativní moče o objemu 1 ml muskarinem na tři koncentrace: 0,0003, 0,2 and 2,0 µg/ml. Šestibodová kalibrační křivka v rozsahu od 0,3 ng/ml do 2 µg/ml byla připravena naspikováním 1 ml negativní moče po extrakci příslušným množstvím muskarinu a interního standardu.

Negativní moč byla vždy před použitím testována na možnou přítomnost muskarinu a acetylovaného muskarinu.

4.11.3. Metoda izolace muskarinu z moče

Pro extrakci muskarinu z moče byla použita extrakce na pevné fázi – diskutováno viz kapitola 5.5.2, str. 71.

4.11.4. Selektivita

Třicet vzorků moče od třiceti zdravých dobrovolníků byly analyzovány na možnou přítomnost interferujících piků, které by mohli ovlivňovat identifikaci a stanovení muskarinu a acetylovaného muskarinu. Rovněž moč od pacientů s podezřením na intoxikaci muskarinem byla testována na přítomnost acetylovaného muskarinu.

4.11.5. Linearita

Extrakty negativní moče o objemu 100 μ l byly naspikovány na koncentrace 0,0003, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 a 2,0 μ g/ml příslušným množstvím muskarinu a do každého vzorku bylo přidáno 10 μ l interního standardu o koncentraci 2,0 μ g/ml. Linearita byla měřena během třech následujících dní.

4.11.6. Preciznost a přesnost

Preciznost a přesnost byla spočítána ze třech koncentrací (nízká 0,0003 μ g/ml, střední 0,2 μ g/ml a vysoká 2,0 μ g/ml), měřených v pěti opakováních ve třech po sobě jdoucích dnech. Relativní směrodatná odchylka charakterizuje preciznost měření a relativní chyba přesnost měření.

4.11.7. Limit detekce a limit kvantifikace

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) byly stanoveny jako poměr šumu a signálu 3:1, respektive 10:1.

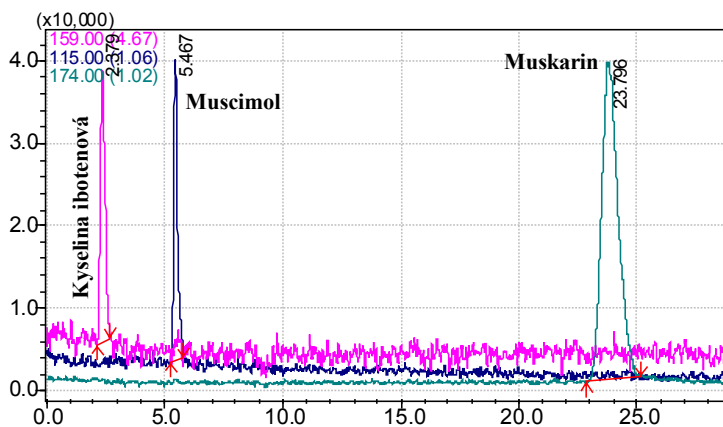
4.11.8. Výtěžnost

Výtěžnost SPE postupu byla testována pro tři různé koncentrace: 0,0003 µg/ml, 0,2 µg/ml a 2,0 µg/ml muskarinu a 0,02 µg/ml interního standardu.

5. Výsledky a diskuze

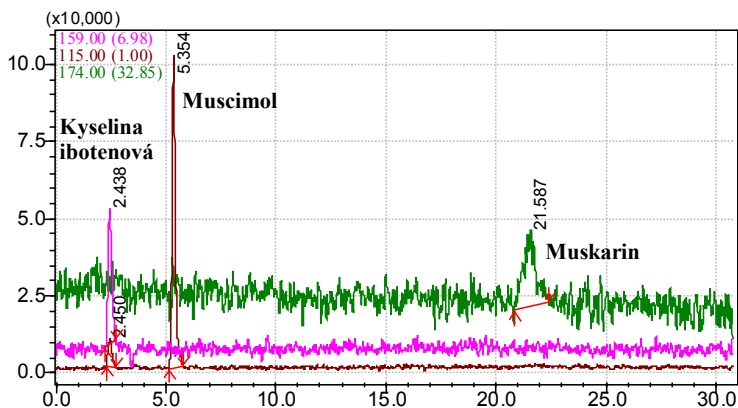
5. 1. Volba iontového zdroje

U ESI v kladném módu byla pozorována dobrá odezva pro všechny tři studované látky (obrázek 6).



Obr. 6: Chromatografický záznam studovaných látek při použití ESI+.

Při použití APCI v kladném módu byl oproti ESI+ pozorován řádově nižší signál pro kyselinu ibotenovou a signál muskarinu byl na úrovni šumu. U muscimolu byla odezva naopak řádově vyšší než u ESI+ (obrázek 7).



Obr. 7: Chromatografický záznam studovaných látek při použití APCI+.

APCI v záporném módu neposkytovala signál kyseliny ibotenové ani muscimolu. Rovněž u ESI v záporném módu nebyl pozorován měřitelný signál pro kyselinu ibotenovou a muscimol. Vzhledem ke skutečnosti, že je muskarin silnou kvartérní bází, nemá význam měřit jeho signál v záporném módu.

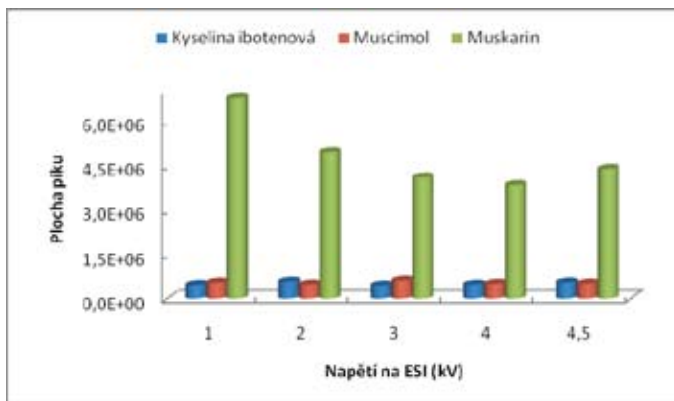
Snahou bylo analyzovat kyselinu ibotenovou, muscimol a muskarin v jednom chromatografickém kroku, proto je nejvhodnější ionizace elektrosprejem v kladném módu. Nicméně pokud by šlo pouze o studium muscimolu, může být kromě ionizace elektrosprejem v kladném módu použita i chemická ionizace za atmosférického tlaku, rovněž v kladném módu.

5. 2. Nalezení vhodných parametrů MS

Základním parametrem, který ovlivňuje ionizaci látek je napětí na iontovém zdroji, v tomto případě na elektrospreji. Závislost odezvy jednotlivých analytů na napětí na elektrospreji znázorňuje tabulka 8 a obrázek 8.

Napětí na ESI (kV)	Plocha píku		
	Kyselina ibotenová	Muscimol	Muskarin
1	455333	527732	6747328
2	561452	468029	4927023
3	437025	595722	4077678
4	460591	491914	3825846
4,5	534885	499709	4361626

Tab. 8: Závislost odezvy jednotlivých analytů na měnícím se napětí na elektrospreji.

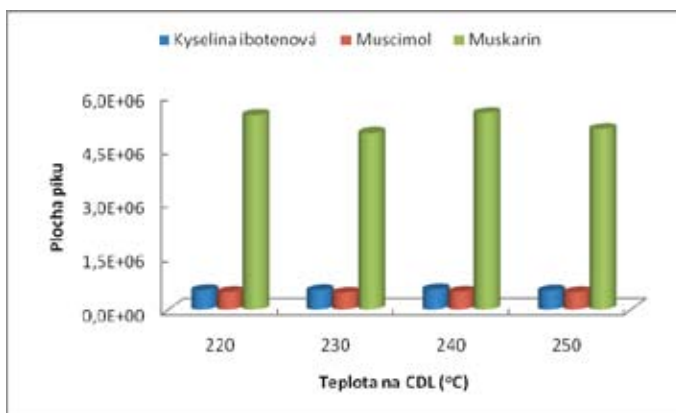


Obr. 8: Graf závislosti odezvy jednotlivých analytů na měnícím se napětí na elektrospreji.

Kompromisem bylo zvoleno napětí na elektrospreji 2 kV. Při tomto napětí byla testována závislost odezvy jednotlivých analytů na změně teploty na CDL (tabulka 9 a obrázek 9).

Teplota CDL (°C)	Plocha píku		
	Kyselina ibotenová	Muscimol	Muskarin
220	537195	488482	5425249
230	539502	468029	4927023
240	561452	495976	5488723
250	530142	483851	5044161

Tab. 9: Závislost odezvy jednotlivých analytů na měnící se teplotě na CDL.

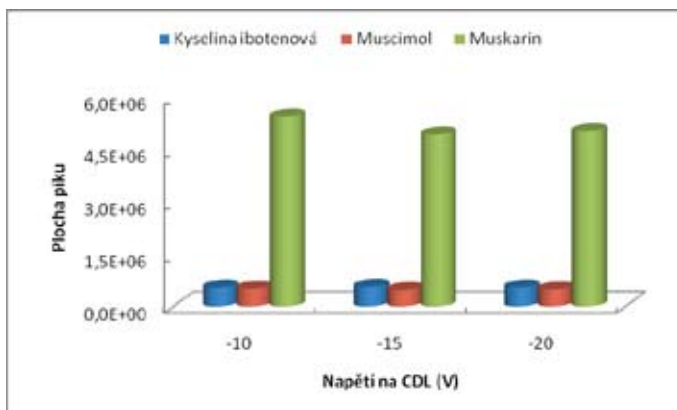


Obr. 9: Graf závislosti odezvy jednotlivých analytů na měnící se teplotě na CDL.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo při teplotě na CDL 240 °C. Při této teplotě byla testována odezva analytů v závislosti na měnícím se napětí na CDL (tabulka 10, obrázek 10).

Napětí na CDL (V)	Plocha píku		
	Kyselina ibotenová	Muscimol	Muskarin
-10	538330	508474	5435573
-15	561452	468029	4927023
-20	541057	486719	5022273

Tab. 10: Závislost odezvy jednotlivých analytů na měnícím se napětí na CDL.

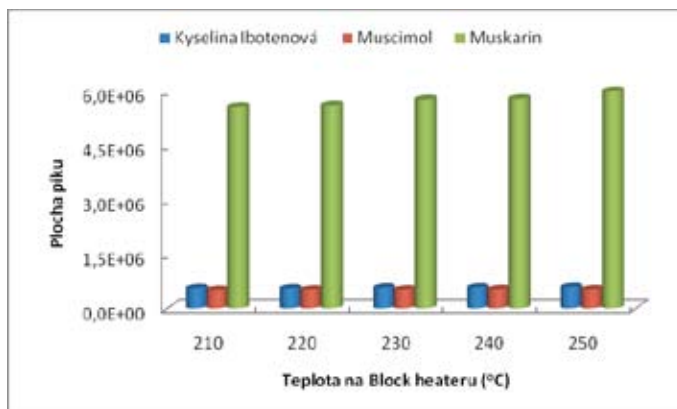


Obr. 10: Graf závislosti odezvy jednotlivých analytů na měnícím se napětí na CDL.

Nejlepší odezva pro jednotlivé látky byla zjištěna při napětí na CDL -10 V. Dalším testovaným parametrem byla teplota na Block heateru (tabulka 11, obrázek 11). Nejlepších výsledků bylo dosaženo při 250 °C.

Teplota na Block heateru (°C)	Plocha píku		
	Kyselina ibotenová	Muscimol	Muskarin
210	556208	507239	5549839
220	549981	514288	5596472
230	571942	517506	5754781
240	575191	528575	5772698
250	586876	523706	5979766

Tab. 11: Závislost odezvy jednotlivých analytů na měnící se teplotě na Block heateru.



Obr. 11: Graf závislosti odezvy jednotlivých analytů na měnící se teplotě na Block heateru.

V tabulce 12 jsou shrnuty použité parametry iontového zdroje a iontové optiky.

Iontový zdroj	ESI
Mód	kladný
Napětí kapiláry ESI	2 kV
Teplota na CDL	240 °C
Napětí na CDL	-10 V
Teplota na Block heateru	250 °C
Průtok sušícího plynu	1,5 l/min

Tab. 12: Použité parametry iontového zdroje a iontové optiky.

5. 3. Určení podmínek LC

Kolona Gemini C18 (50 × 2.0 mm i.d., 5 μm)

Při použití této kolony s testovanými mobilními fázemi (str. 40) nebyly pozorovány retence sledovaných analytů a to i přesto, že byly použity triethylamin a kyselina trifluorooctová. Jde o ion-párová činidla, která se navážou na ion měřené látky za vzniku relativně stabilních iontových párů. Nevýhodou těchto ion-párových činidel je jejich nízká těkavost, proto může dojít k potlačení signálu stanovované látky.

Kolona Synergi Fusion RP 80 (150 × 2.0 mm i.d., 4 μm)

Kolona obsahuje vložené polární skupiny, z tohoto důvodu je vhodná k analýze velmi polárních látek. Nicméně za použití uvedených mobilních fází (str. 41) nebyla pozorována retence kyseliny ibotenové a muscimolu, muskarin byl z kolony eluován v mrtvém čase kolony. Na základě těchto výsledků bylo přistoupeno k použití kyseliny heptafluoromáselné. Rovněž se jedná o ion-párové činidlo, které se naváže na ion měřené látky za vzniku relativně stabilního iontového páru. Použitím této kyseliny došlo ke zlepšení retence všech tří látek. Přesto však eluce kyseliny ibotenové

a muscimolu z kolony probíhá ve stejném retenčním čase jako eluce balastních látek z biologických materiálů, což stěžuje identifikaci sledovaných analytů. Rovněž použití kolony Synergy Fusion (vzhledem k vloženým polárním skupinám) ve spojení s ion-párovým činidlem není příliš ideální, proto se přistoupilo k použití kolony Gemini C18 s reverzní fází.

Kolona Gemini C18 (150 × 2.0 mm i.d., 5 μm)

Ve spojení s kyselinou heptafluoromáselnou lze pozorovat malou retenci kyseliny ibotenové a muscimolu, retence muskarinu je dostatečná. Za účelem zvýšení retence kyseliny ibotenové a muscimolu byla testována vyšší koncentrace kyseliny heptafluoromáselné. Závislost retence kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu na zvyšující se koncentraci kyseliny heptafluoromáselné je zobrazena v tabulce 13.

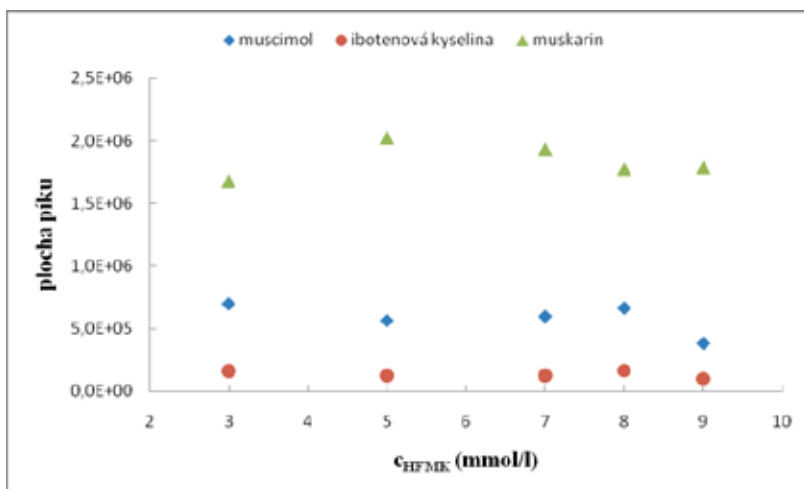
HFMK c (mmol/l)	Retenční čas (min)		
	Muscimol	Kyselina ibotenová	Muskarin
3	4,63	2,20	16,50
5	5,22	2,25	21,66
7	5,47	2,37	24,64
8	5,44	2,37	24,13
9	5,46	2,38	23,80

Tab. 13: Závislost retenčních časů kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu na zvyšující se koncentraci kyseliny heptafluoromáselné.

Rovněž byla studována závislost odezvy sledovaných látek na koncentraci kyseliny heptafluoromáselné (tabulka 14, obrázek 12).

HFMK c (mmol/l)	Plochy píků		
	Muscimol	Kyselina ibotenová	Muskarin
3	699843	160513	1676650
5	564386	124857	2026510
7	597939	122690	1931390
8	665578	163726	1774400
9	381881	97960	1787800

Tab. 14: Závislost odezvy kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu na zvyšující se koncentraci kyseliny heptafluoromáselné.



Obr. 12: Graf závislosti odezvy kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu na zvyšující se koncentraci kyseliny heptafluoromáselné.

Jako nejvhodnější mobilní fáze byl vybrán vodný roztok kyseliny heptafluoromáselné o koncentraci 8 mmol/l. Nejdůležitějším kritériem pro tento výběr byl především retenční čas kyseliny ibotenové a muscimolu. Obecně mohou ion párová činidla rovněž potlačit odezvu analytů v ESI vytvořením neutrálního ion páru. Proto

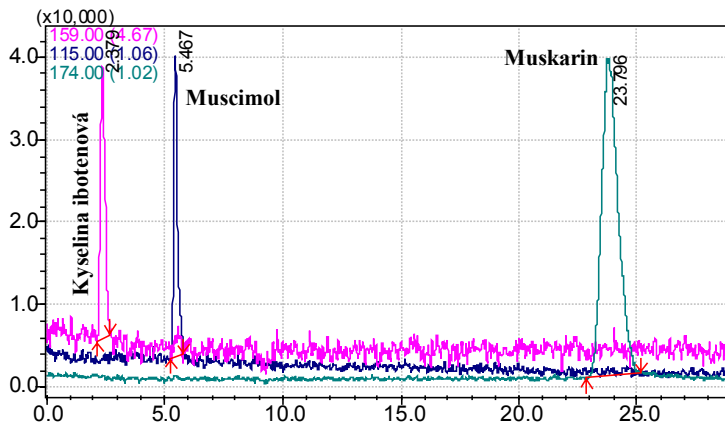
byly měřeny odezvy studovaných látek v mobilní fázi obsahující kyselinu heptafluoromáselnou a bez přidavku kyseliny heptafluoromáselné, aby se zjistila míra suprese způsobena ion-párovým činidlem. Na kvadrupólovém systému byla odezva látek v přítomnosti kyseliny heptafluoromáselné snížena zhruba o 30 % oproti naměřené odezvě látek bez přítomnosti kyseliny heptafluoromáselné. Tento experiment byl testován také na systému s iontovou pastí. Zde byla ztráta signálu látek v přítomnosti ion-párového činidla snížena zhruba o 40 %. Nicméně intenzita signálu látek byla pořád dostačující pro testování koncentrací, které jsou očekávány v reálných vzorcích intoxikovaných pacientů.

Vzhledem k použití kolony obsahující reverzní fázi je vhodné, aby mobilní fáze obsahovala organické rozpouštědlo. Z tohoto důvodu byly testovány mobilní fáze obsahující přídavek od 2 do 12 % methanolu, respektive acetonitrilu. Ukázalo se, že obohacení mobilní fáze organickou složkou není vhodné pro kyselinu ibotenovou a muscimol z důvodu snížení jejich retenčních časů a dále při opakovaném měření docházelo k poklesu jejich odezvy (vlivem organické fáze zřejmě docházelo k porušení rovnováhy mezi kyselinou heptafluoromáselnou a sorbentem analytické kolony, mohlo také docházet k mírné modifikaci sorbentu kolony). U muskarinu naopak přidavkem methanolu a acetonitrilu k mobilní fázi došlo k výraznému navýšení jeho odezvy (tabulka 15), rovněž došlo ke snížení jeho retence.

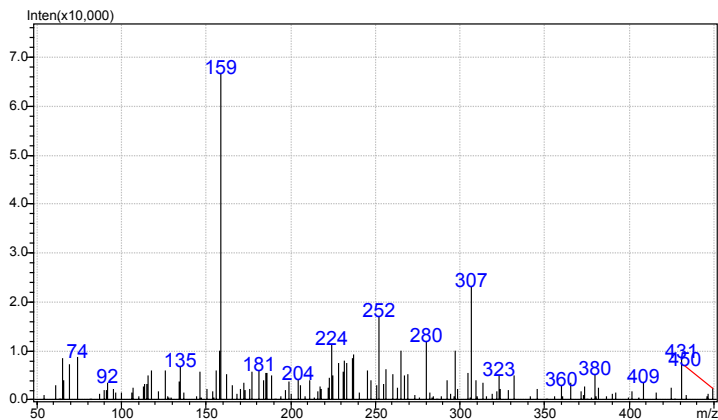
MeOH v MF (%)	Muskarin plocha píku	Rt (min)	ACN v MF (%)	Muskarin plocha píku	Rt (min)
2	1637890	26,6	0	1774400	23,7
4	1852390	19,8	5	2660310	18,2
6	2032170	18,1	8	3264630	16,4
8	2187920	17,1	12	4002110	15,2
12	2619670	15,9			

Tab. 15: Závislost odezvy a retenčního času muskarinu na přidavku methanolu a acetonitrilu do mobilní fáze.

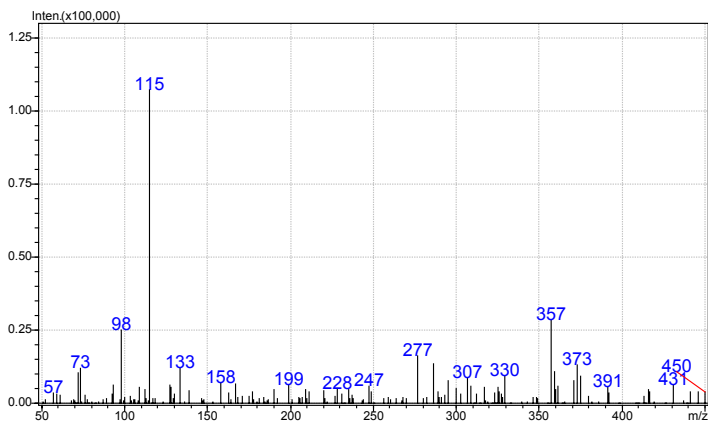
Nakonec bylo upuštěno od obohacení mobilní fáze organickou složkou. Jako mobilní fáze byl použit pouze vodný roztok 8 mmol/l kyseliny heptafluoromáselné. Chromatografický záznam směsného standardu obsahující kyselinu ibotenovou a muscimol o koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ a muskarin o koncentraci 0,2 $\mu\text{g/ml}$ je uveden na obrázku 13. Hmotnostní spektra jednotlivých látek jsou uvedeny na obrázcích 14 – 16.



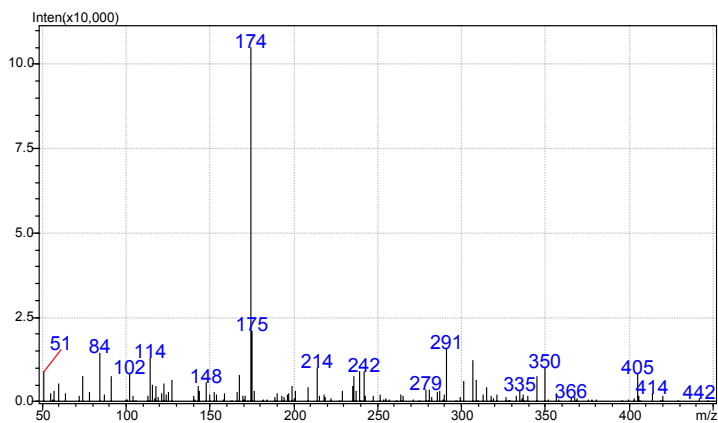
Obr. 13: Chromatografický záznam směsného standardu.



Obr. 14: Hmotnostní spektrum kyseliny ibotenové.



Obr. 15: Hmotnostní spektrum muscimolu.



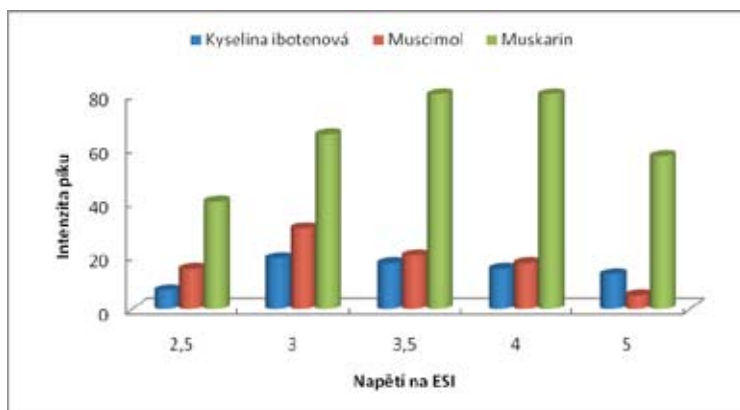
Obr. 16: Hmotnostní spektrum muskarinu.

5. 4. Měření fragmentačních spekter

Fragmentace byla měřena při ionizaci elektrosprejem v kladném módu. Nejprve byly optimalizovány podmínky nastavení přístroje, aby bylo dosaženo nejlepší odezvy studovaných analytů. Byla testována závislost odezvy sledovaných analytů na napětí na kapiláře ESI (tabulka 16 a obrázek 17), na teplotě a vloženém napětí na vyhřívané kapiláře (tabulka 17 a 18 a obrázky 18 a 19).

Napětí na ESI (kV)	Intenzita píku		
	Kyselina ibotenová	Muscimol	Muskarin
2,5	7	15	40
3	19	30	65
3,5	17	20	80
4	15	17	80
5	13	5	57

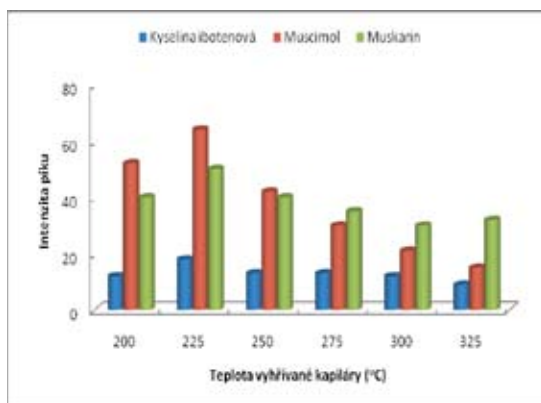
Tab. 16: Závislost odezvy jednotlivých analytů na měnícím se napětí na ESI.



Obr. 17: Graf závislosti odezvy jednotlivých analytů na měnícím se napětí na ESI.

Teplota vyhřívání kapiláry (°C)	Intenzita píku		
	Kyselina ibotenová	Muscimol	Muskarin
200	12	52	40
225	18	64	50
250	13	42	40
275	13	30	35
300	12	21	30
325	9	15	32

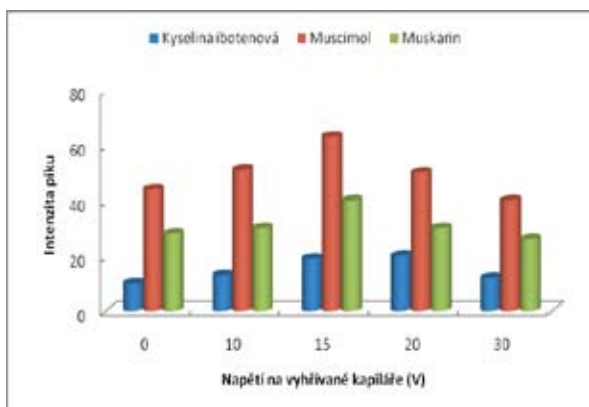
Tab. 17: Závislost odezvy jednotlivých analytů na měnící se teplotě vyhřívání kapiláry.



Obr. 18: Graf závislosti odezvy jednotlivých analytů na měnící se teplotě vyhřívání kapiláry.

Napětí na vyhřívané kapiláře (V)	Intenzita píku		
	Kyselina ibotenová	Muscimol	Muskarin
0	10	44	28
10	13	51	30
15	19	63	40
20	20	50	30
30	12	40	26

Tab. 18: Závislost odezvy jednotlivých analytů na měnícím se napětí vyhřívané kapiláry.



Obr. 19: Graf závislosti odezvy jednotlivých analytů na měnícím se napětí vyhřívané kapiláry.

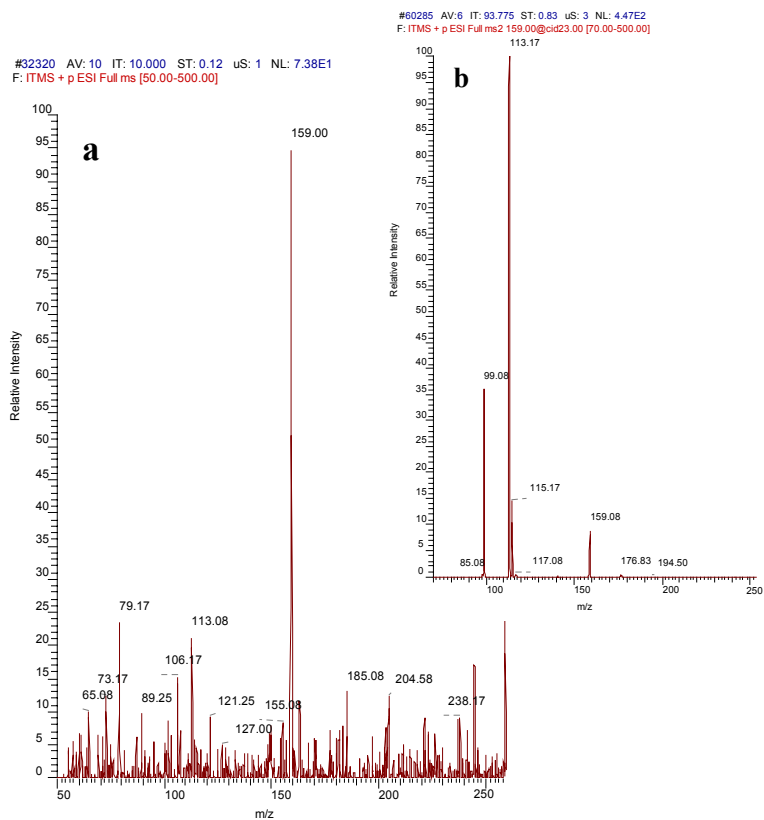
V tabulce 19 jsou shrnuty použité parametry iontového zdroje a iontové optiky.

Napětí na kapiláře ESI	3 kV
Teplota vyhřívané kapiláry	225 °C
Napětí na vyhřívané kapiláře	15 V
Výbojový proud	25 μ A
Průtok zmlžovacího plynu	50 arb units

Tab. 19: Použité parametry iontového zdroje a iontové optiky.

5.4.1. Fragmentace kyseliny ibotenové

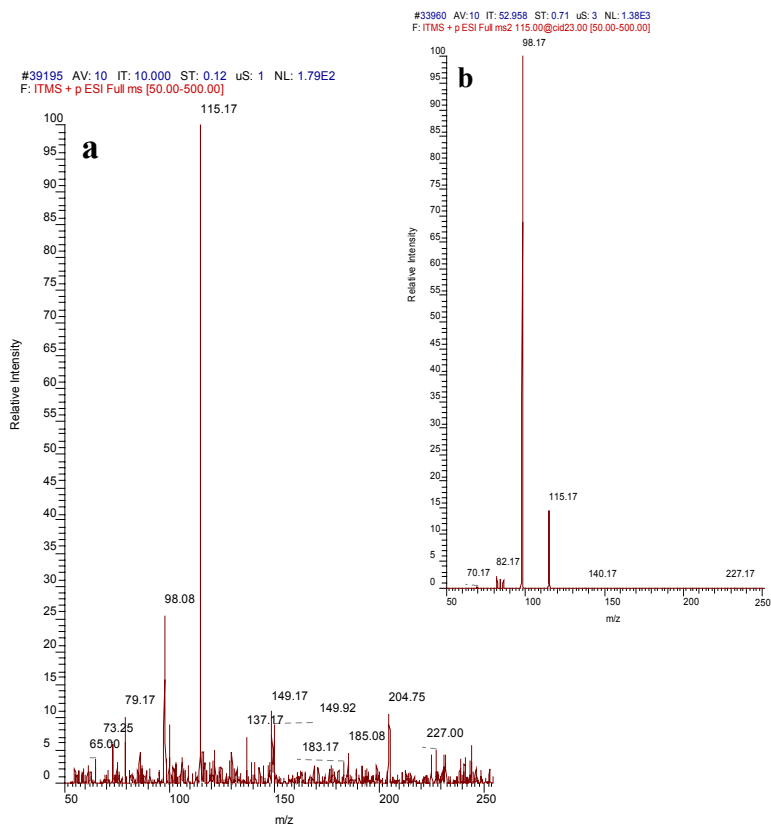
Byl pozorován intenzivní ion m/z 159 $[M+H]^+$, který odpovídá základnímu píku ve full scanu. Jeho fragmentace vede k vytvoření fragmentačních iontů m/z 113 $[M+H-COOH]^+$ (100 %) a m/z 99 (36 %), kolizní energie 23 % (obrázek 20).



Obr. 20: Hmotnostní spektrum kyseliny ibotenové (a) a MS/MS spektrum iontu m/z 159 (b).

5.4.2. Fragmentace muscimolu

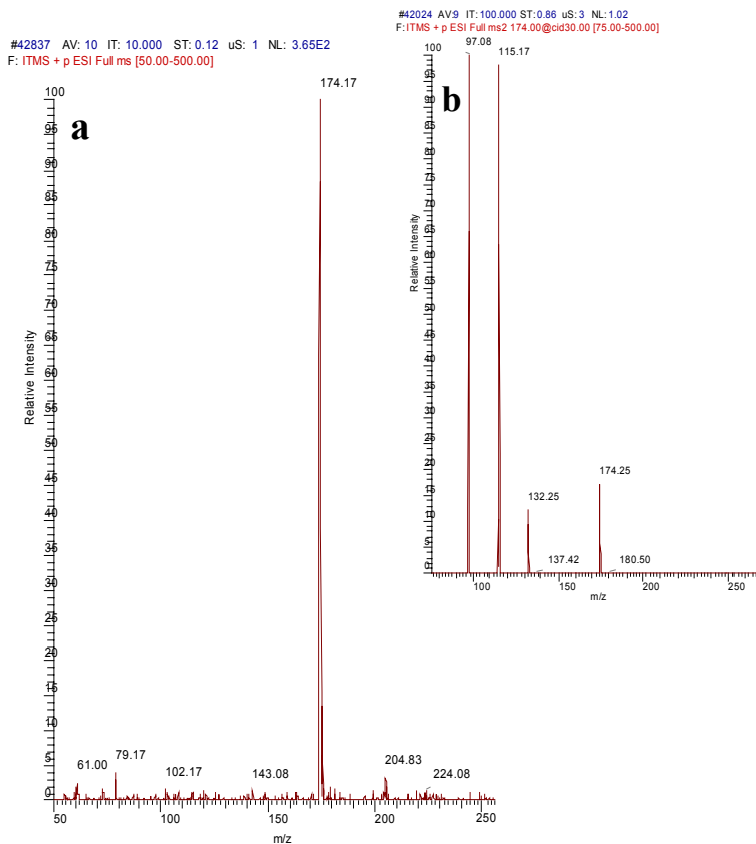
Byl pozorován intenzivní ion m/z 115 $[M+H]^+$, který odpovídá základnímu píku ve full scanu. Jeho fragmentace vede k vytvoření fragmentačních iontů m/z 98 $[M+H-NH_3]^+$ (100 %), kolizní energie 23 % (obrázek 21).



Obr. 21: Hmotnostní spektrum muscimolu (a) a MS/MS spektrum iontu m/z 115 (b).

5.4.3. Fragmentace muskarinu

Byl pozorován intenzivní ion m/z 174 [M^+], který představuje základní pik ve full scanu. Jeho fragmentace vede ke dvěma hlavním fragmentačním iontům m/z 115 [$M-N(CH_3)_3$] $^+$ (97 %) a m/z 97 [$M-N(CH_3)_3-H_2O$] $^+$ (100 %), kolizní energie 32 % (obrázek 22).

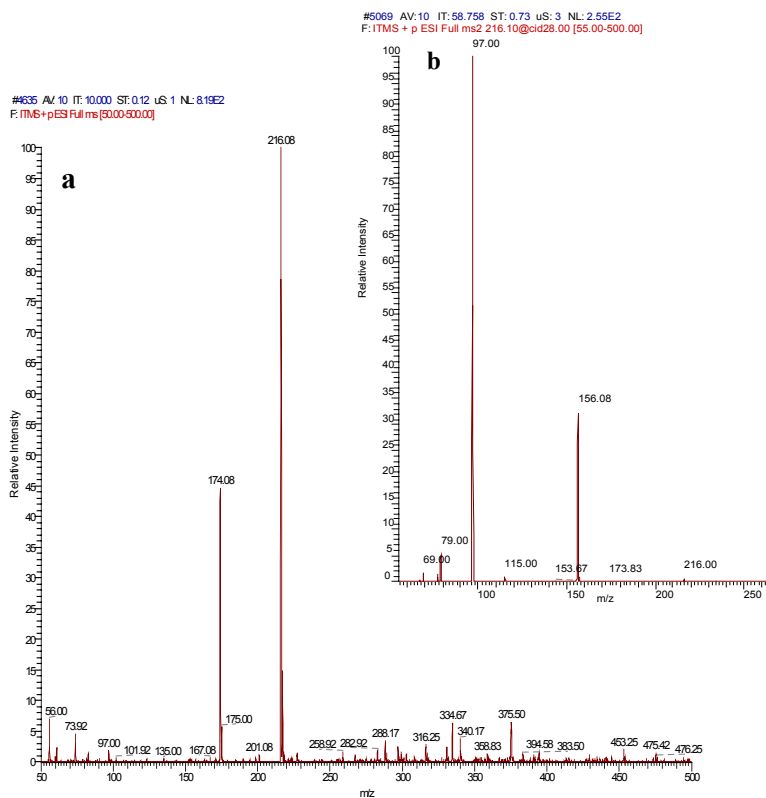


Obr. 22: Hmotnostní spektrum muskarinu (a) a MS/MS spektrum iontu m/z 174 (b).

5.4.4. Fragmentace acetylovaného muskarinu

Acetylovaný analog muskarinu byl použit jako interní standard při validaci metody vhodné ke stanovení muskarinu z moče intoxikovaných osob.

Byl pozorován intenzivní ion m/z 216 $[M]^+$, který představuje základní pík ve full scanu. Jeho fragmentace vede ke dvěma hlavním fragmentačním iontům m/z 156 $[M-CH_3COOH]^+$ (34 %) a m/z 97 $[M-CH_3COOH-N(CH_3)_3]^+$ (100 %). Kolizní energie 28 % (obrázek 23).



Obr. 23: Hmotnostní spektrum acetylovaného muskarinu (a) a MS/MS spektrum iontu m/z 216 (b).

5. 5. Izolační metody

5. 5. 1. Extrakce kapalina-kapalina (LLE)

Při jednotlivých extrakcích do etheru, ethylacetátu, směsi ether:ethylacetát 1:1, toluenu, *n*-hexanu a dichlormethanu nebyla prokázána v moči přítomnost kyseliny ibotenové a muscimolu. Přítomnost stopového množství muskarinu byla potvrzena v odparcích okyselených vzorků moče, které byly extrahovány do etheru, ethylacetátu a směsi ether:ethylacetát 1:1. Vzhledem k polárnímu charakteru studovaných látek byl tento výsledek předpokládán. Extrakce kapalina-kapalina není vhodná pro izolaci kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu z moče.

5. 5. 2. Extrakce na pevné fázi (SPE)

Strata X

Při použití postupu popsaného v experimentální části (viz str. 44) se nepodařilo prokázat ve vzorku přítomnost kyseliny ibotenové a muscimolu. Výtěžnost muskarinu byla v jednotkách procent. Nízká výtěžnost může být způsobena vymýváním analytů v promývacím kroku, proto se následně v promývacím kroku použil pouze 10 % vodný roztok methanolu. Tento krok rovněž nepřinesl uspokojivé zvýšení výtěžnosti extrakce. Byly vyzkoušeny další postupy extrakce - kondicionace kolonky byla provedena methanolem a následně 5 % NH_4OH nebo methanolem, vodou a sodiumdodecyl-sulfátem, který by teoreticky měl lépe zadržet kyselinu ibotenovou a mucimol na sorbentu kolonky. Jako eluční činidla byla vyzkoušena methanol, 5 % kyselina mravenčí v methanolu nebo 5 % NH_4OH v methanolu, rovněž aceton nebo acetonitril.

Žádným z uvedených postupů se nepodařilo ve zpracovaných vzorcích moče prokázat kyselinu ibotenovou a muscimol. U muskarinu jsou výtěžnosti v rozmezí od 5 % do 70 %. Extrakční postup, kterým se podařilo extrahovat muskarin se 70 % výtěžnosti je následující:

kondicionace: 2 ml methanolu

2 ml deionizované vody

2 ml 2 mmol/l sodiumdodecylsulfátu

aplikace vzorku: 1 – 2 kapky za sekundu

promytí: 2 ml 30 % methanolu, následováno sušením za vakua (1 min)

eluce: 2 ml methanolu

Strata X-CW, Discovery WCX

Jako vhodnější volba pro extrakci daných látek z moče se jeví použití slabého katexu s reverzní fází, jelikož kyselina ibotenová a muscimol obsahují NH_2 skupinu a muskarin kvartérní amin.

Postupem uvedeným v experimentální části (viz str. 45) se nepodařilo ve vzorku prokázat přítomnost kyseliny ibotenové a muscimolu. Výtěžnost muskarinu se pohybovala kolem 61 %. Nulová výtěžnost nebo nízká výtěžnost extrakce jednotlivých látek může být způsobena několika okolnostmi: špatně zvoleným postupem, při promytí kolonky dochází k uvolnění a eluci látek ze sorbentu kolonky či špatně zvoleným elučním krokem, kdy naopak nedojde k eluci látky. Z těchto důvodů bylo vyzkoušeno několik dalších modifikací popsaného postupu pro dosažení lepších výtěžností kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu. Nejprve byla v elučním kroku zvýšena koncentrace methanolickeho roztoku kyseliny mravenčí na 7,5 %. Byla přidána eluce 5 % NH_4OH v methanolu. Eluce byla rovněž provedena směsí methanolickeho roztoku hydroxidu sodného a pyridinu v různém koncentračním poměru. Žádným postupem se nepodařilo prokázat kyselinu ibotenovou a muscimol ve vzorcích moče. Nicméně tento typ kolonky se jevil jako velmi vhodný pro extrakci muskarinu z moče. Pro dosažení lepší výtěžnosti muskarinu bylo experimentováno i s kondicionací kolonky. Nejlepších výsledků bylo dosaženo kondicionací kolonky methanolem a 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou. Tímto krokem výtěžnost muskarinu dosáhla 95 %.

Extrakční postup, který vykazuje 95 % výtěžnost muskarinu je následující:

kondicionace: 2 ml methanolu

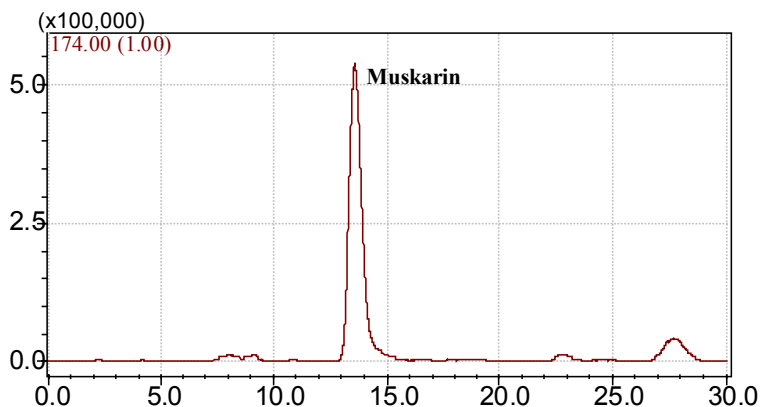
2 ml 0,1 M kyseliny chlorovodíkové

aplikace vzorku: 1-2 kapky za sekundu

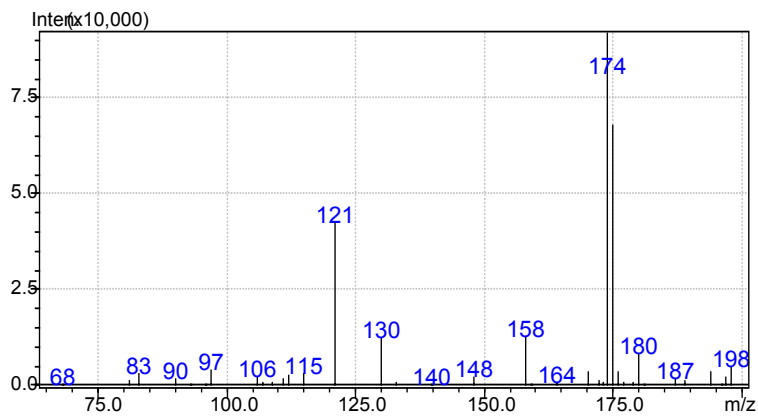
promytí: 2 ml acetátového pufru (pH 4,5), následováno sušením za vakua
(1 min)

eluze: 2 ml 5 % kyseliny mravenčí v metanolu

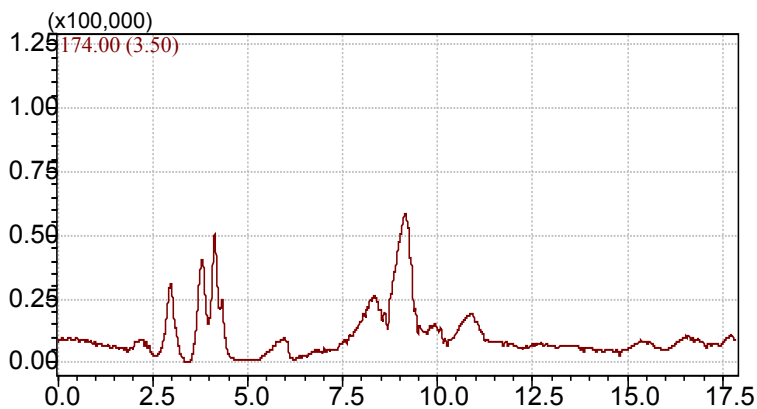
Obrázky 24 a 25 znázorňují chromatografický záznam muskarinem spikované moče po SPE a jeho hmotnostní spektrum. Na obrázcích 26 a 27 je zobrazen chromatografický záznam negativní moče po extrakci a její hmotnostní spektrum odečtené v retenčním čase muskarinu.



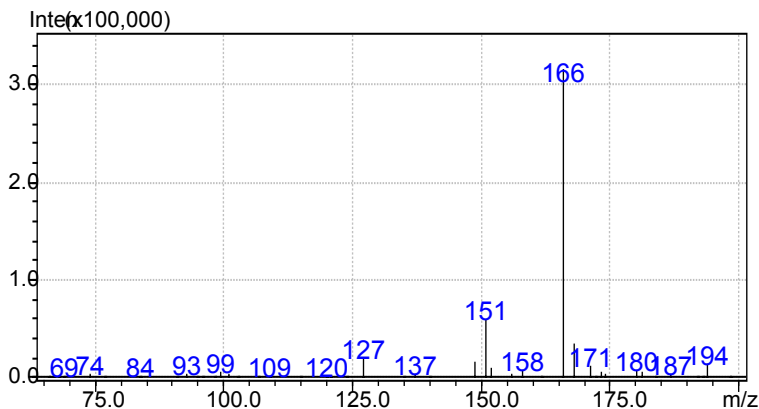
Obr. 24: Chromatografický záznam muskarinem spikované moče po SPE.



Obr. 25: Hmotnostní spektrum muskarinu.



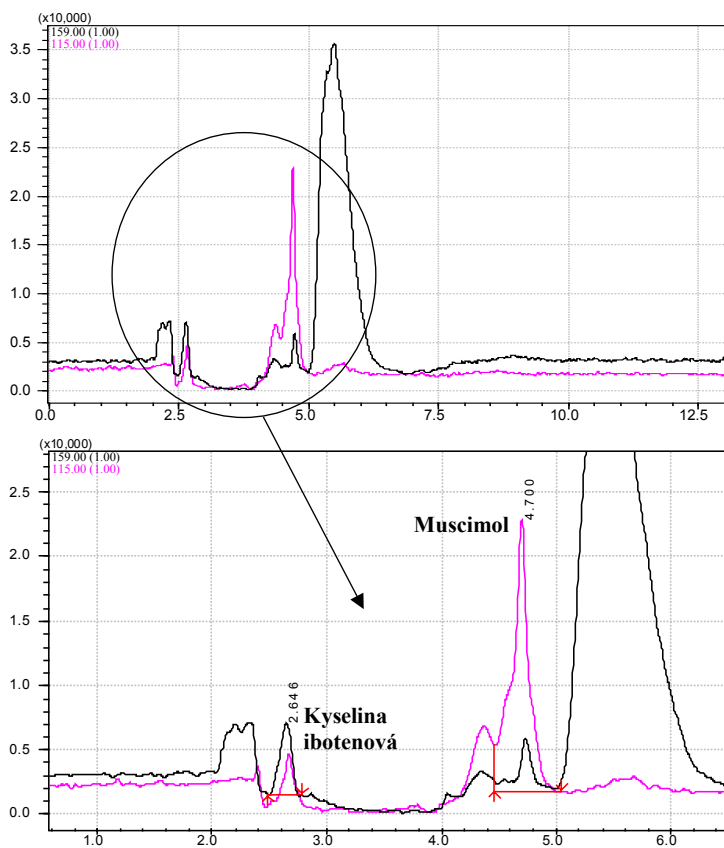
Obr. 26: Chromatografický záznam negativní moče po SPE.



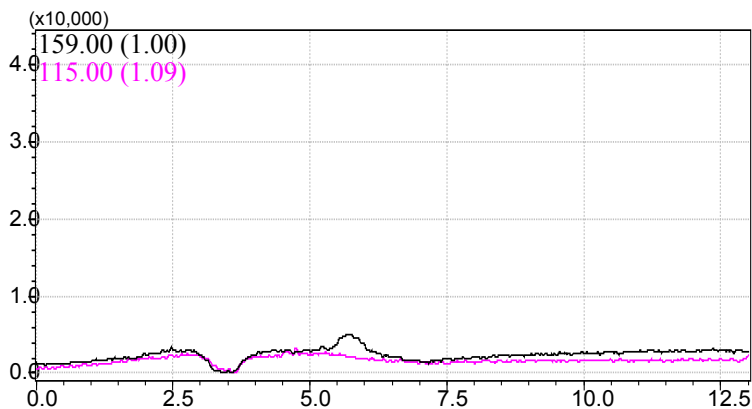
Obr. 27: Hmotnostní spektrum negativní moče po SPE v $R_t = 13,7$ min.

Discovery SCX

Postupem uvedeným v experimentální části (viz str. 45) byla v daných vzorcích prokázána přítomnost kyseliny ibotenové a muscimolu. Tímto extrakčním postupem bylo dosaženo 15 % výtěžnosti pro kyselinu ibotenovou a 22 % výtěžnosti pro muscimol. Na obrázku 28 je zobrazen chromatografický záznam moče spikované kyselinou ibotenovou a muscimolem po SPE. Výtěžnost muskarinu se pohybovala v jednotkách procent. Obrázek 29 zobrazuje chromatografický záznam negativní moče po extrakci. Jako eluční činidla byly rovněž testovány: 2 % triethylamin v 65 % methanolu, směs 1 % NaOH : ethanol : pyridin (7,5:4:1, respektive 7,5:4:2), 1 % NaOH v methanolu. Nicméně ve vzorcích moče zpracovaných těmito postupy se nepodařilo prokázat přítomnost kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu. V dalším zkoušeném postupu byla SPE kolonka kondicionována 2 ml ethanolu, následováno 2 ml deionizované vody, poté byl aplikován vzorek (2 ml spikované moče). Po promytí (směs deionizované vody a ethanolu 2:1) byla kolonka 1 min sušena za vakua. Eluce byla provedena směsí 1 % NaOH : ethanol : pyridin (7,5:4:1). Tímto postupem se rovněž nepodařilo prokázat přítomnost kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu ve vzorku moče.



Obr. 28: Chromatografický záznam negativní moče spikované ibotenovou kyselinou a muscimolem po SPE.



Obr. 29: Chromatografický záznam negativní moče po SPE.

Strata Screen A, Strata AW

Kyselina ibotenová, kromě NH_2 skupiny, obsahuje rovněž karboxylovou a hydroxylovou funkční skupinu, také muscimol obsahuje OH skupinu. Z tohoto důvodu byly k izolaci těchto látek z moče vyzkoušeny rovněž SPE kolonky působící na bázi silného a slabého anexu. Ve vzorcích moče zpracovaných dle postupu uvedeného v experimentální části (viz str. 45) se nepodařilo prokázat kyselinu ibotenovou ani muscimol. Daný postup byl modifikován – uhličitanový pufr (pH 10) byl nahrazen fosfátovým pufrem o pH 7 a také 5 % NH_4OH v methanolu. Rovněž byly vyzkoušeny bazické eluce (5 % NH_4OH v methanolu, 1% NaOH v methanolu nebo ve směsi methanol – pyridin). Opět se ve zpracovaných vzorcích moče neprokázala přítomnost kyseliny ibotenové a muscimolu.

Další použité SPE kolonky

V dalších experimentech byly testovány také kolonky Strata X-CN, Strata NH_2 a Discovery MCAX. Opět se nepodařilo prokázat přítomnost kyseliny ibotenové

a muscimolu. Výtěžnosti muskarinu byly proměnlivé v závislosti na zvoleném postupu, nicméně nebylo již dosaženo tak dobrých výsledků, jako u kolonek Strata X-CW, Discovery WCX a Strata X.

Nulová nebo velmi nízká výtěžnost kyseliny ibotenové a muscimolu může být způsobena několika faktory. Nemusí se jednat o nevhodný postup extrakce, ale problém může být v krátkém retenčním čase těchto látek, kdy jsou z kolony eluovány spolu s balastními látkami, a tak může docházet k potlačení jejich ionizace. V současné době dochází k rozvoji nových analytických technik a jedním z možných řešení se jeví použití HILIC analytických kolon, které pracují na principu hydrofilních interakcí. Rovněž se začínají objevovat studie s derivatizačními technikami vhodnými pro systém LC/MS. Derivatizací kyseliny ibotenové a muscimolu se může dosáhnout jednak jejich separace od balastních látek obsažených v biologické matrici, tak i větší citlivosti při analýze. Rovněž je možno využít principu hydrofilních interakcí separace, nejlépe na kolonkách s reverzní fází, i při samotné izolaci těchto látek z moče, popř. jiného biologického materiálu. Naději na určité výsledky dávají i kolonky HybridSPE – Precipitation.

5. 6. Validace metody pro stanovení muskarinu v moči

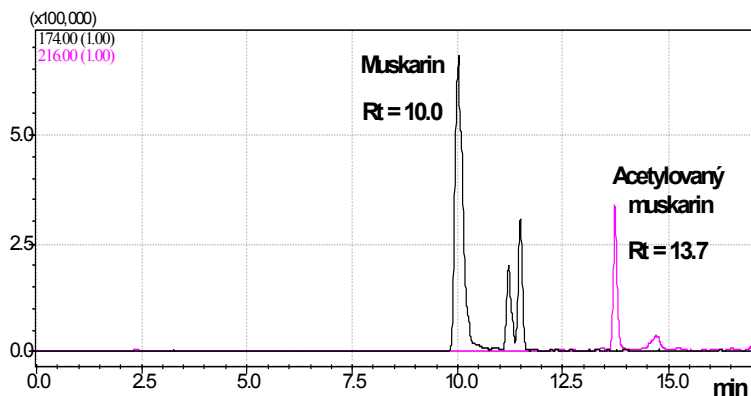
5.6.1. Metoda extrakce muskarinu z moče

Pro extrakci muskarinu z moče byla použita extrakce na pevné fázi, použitím kolonky Strata X-CW. Kolonka byla nejprve kondicionována 2 ml methanolu a 2 ml 0,1 M kyseliny chlorovodíkové. Po aplikaci vzorku (1-2 kapky za sekundu) byla kolonka promyta 2 ml acétátového pufru (pH 4,5), poté následovalo sušení za vakua (1 min). Eluce byla provedena 2 ml 5 % kyseliny mravenčí v methanolu (str. 71). Odparek byl vysušen v proudě dusíku a následně rozpuštěn ve 100 μ l vody.

5.6.2. Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

Analýzy byly provedeny na přístroji LC/MS 2010A s kvadrupólem, ionizace elektrosprejem. Mobilní fáze byla modifikována přidavkem acetonitrilu. Chromatografická separace byla provedena na koloně Gemini C18 (150 $\times$ 2.0 mm i.d., 5 μ m). Mobilní fáze A: 8 mmol/l vodný roztok kyseliny heptafluoromáselné a mobilní fáze B: acetonitril v gradientovém módu: 0 – 15 min: 0 % - 37 % B, 15 – 16 min: 37 % - 0 % B. Následně byla chromatografická kolona 15 minut ekvilibrována mobilní fází A. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 0,2 ml/min. Během celého měření byla kolona temperována na 30 °C. Parametry iontového zdroje a iontové optiky jsou uvedeny v tabulce 12 (str. 56).

K modifikaci mobilní fáze bylo přistoupeno kvůli nutnosti použití acetylovaného muskarinu jako interního standardu. Vodný roztok 8 mmol/l heptafluoromáselné kyseliny reprezentující mobilní fázi je vhodný pro muskarin, nicméně má příliš slabou eluční sílu pro jeho acetylovaný analog. Retenční čas acetylovaného muskarinu byl kolem 40 min. Po přidavku acetonitrilu k mobilní fázi došlo ke zkrácení retenčního času acetylovaného muskarinu (obrázek 30).



Obr. 30: Negativní moč spikovaná muskarinem ($c = 0,2 \mu\text{g/ml}$) a IS ($c = 0,2 \mu\text{g/ml}$) po SPE na kolonce Strata X-CW.

5.6.3. Linearita

Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu od $0,0003$ do $2,0 \mu\text{g/ml}$. Koeficient determinace $0,9993$ indikuje dostačující linearitu metody pro aplikaci v laboratorní praxi při diagnostice muskarinových otrav.

5.6.4. Preciznost a přesnost

Preciznost a přesnost metody byla měřena pro tři vybrané koncentrace v rámci jednoho dne – opakovatelnost a v průběhu třech po sobě následujících dní – mezilehlá preciznost. Získané výsledky preciznosti a přesnosti (tabulka 20 a 21) jsou dostačující pro aplikaci metody v rutinní klinické praxi.

Opakovatelnost (n=5)	Aktuální koncentrace (µg/ml)	Průměrná vypočtená koncentrace (µg/ml)	Preciznost (RSD, %)	Přesnost (rel. chyba, %)
nízká koncentrace	0,0003	0,00029	0,48	-3,3
střední koncentrace	0,2	0,19	0,66	-5
vysoká koncentrace	2	1,91	1,39	-4,5

Tab. 20: Preciznost a přesnost metody měřena v rámci jednoho dne.

Mezilehlá preciznost (n=5) 3 dny	Aktuální koncentrace (µg/ml)	Průměrná vypočtená koncentrace (µg/ml)	Preciznost (RSD, %)	Přesnost (rel. chyba %)
nízká koncentrace	0,0003	0,00029	4,02	-3,33
střední koncentrace	0,2	0,194	5,49	-3
vysoká koncentrace	2	1,88	2,39	-6

Tab. 21: Preciznost a přesnost metody měřena v průběhu třech po sobě následujících dní.

5.6.5. Limit detekce a limit kvantifikace

Limit detekce byl 0,09 ng/ml a limit kvantifikace 0,3 ng/ml při použití 1 ml moče pro extrakci a 5 µl vzorku bylo aplikováno do LC/MS systému.

5.6.6. Výtěžnost

Výtěžnost muskarinu je uvedena v tabulce 22. U interního standardu o koncentraci 0,2 µg/ml byla dosažena 61 % výtěžnost.

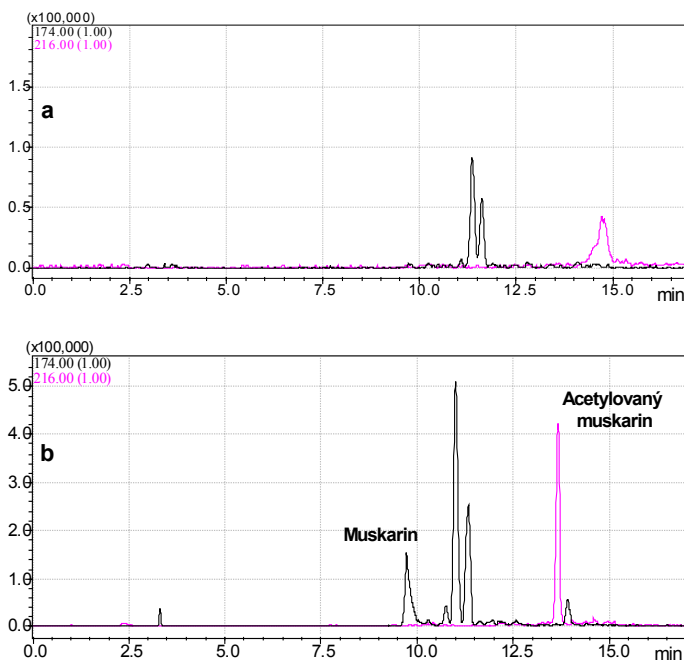
	Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	Výtěžnost (%)
nízká koncentrace	0,0003	96
střední koncentrace	0,2	95
vysoká koncentrace	2	95

Tab. 22: Výtěžnost izolace muskarinu.

5.7. Použití metody LC/MS k identifikaci sledovaných toxinů v moči, séru a žaludečním obsahu intoxikovaných pacientů

Případ č. 1

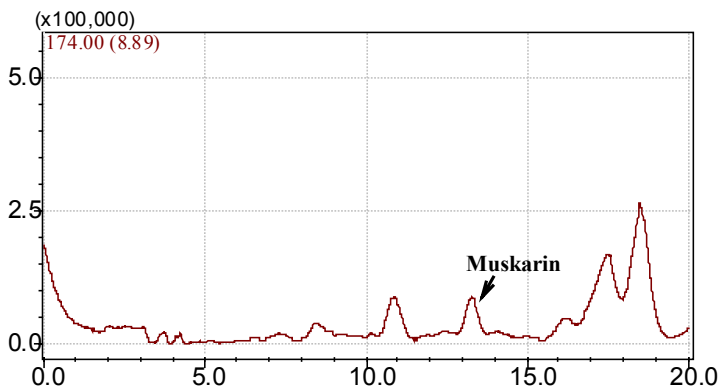
V prvním případě šlo o 55-letého muže, který zmirá na předávkování methadonem. Podle svědka měl několik hodin před smrtí požit odvar z muchomůrky červené. Moč k analýze byla odebrána při pitvě zemřelého. Chromatografický záznam negativní moče a moče pacienta, obojí po extrakci postupem uvedeným v kapitole 5.5.2, (str. 71), je zobrazen na obrázku 31. V moči byla prokázána přítomnost muskarinu a metodou vnitřního standardu stanovena jeho koncentrace 0,045 µg/ml.



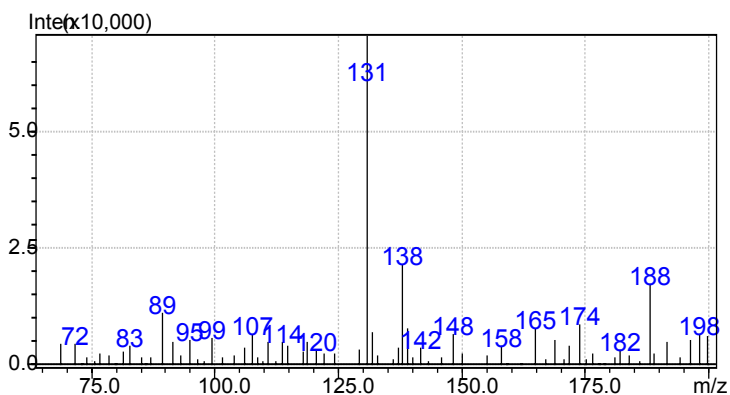
Obr. 31: Chromatografický záznam extraktu negativní moče (a) a extraktu moče zemřelého (b).

Případ č. 2

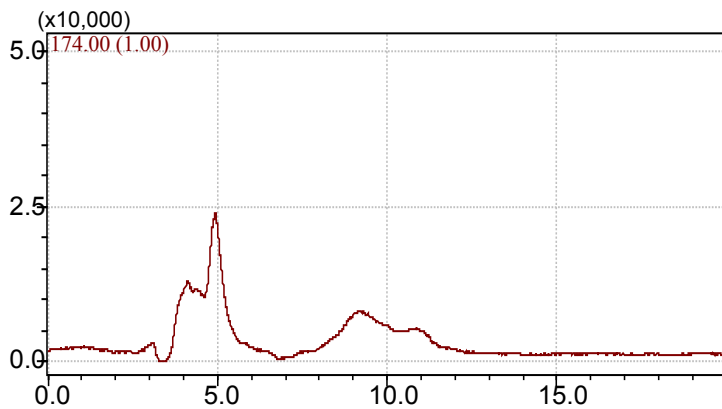
Ve druhém případě šlo o 22 letou ženu, která požíla strmělku bělostnou (*Clitocybe candicans*). U pacientky byla odebrána moč a žaludeční obsah. Metodou LC/MS byla v moči prokázána přítomnost muskarinu, v žaludečním obsahu jeho přítomnost prokázána nebyla. Chromatografický záznam moče pacientky po extrakci a hmotnostní spektrum muskarinu je zobrazeno na obrázcích 32 a 33. Chromatografický záznam žaludečního obsahu pacientky po extrakci je znázorněn na obrázku 34.



Obr. 32: Chromatografický záznam extraktu moče pacientky (MF: 8 mmol.l⁻¹ heptafluoromáselná kyselina).



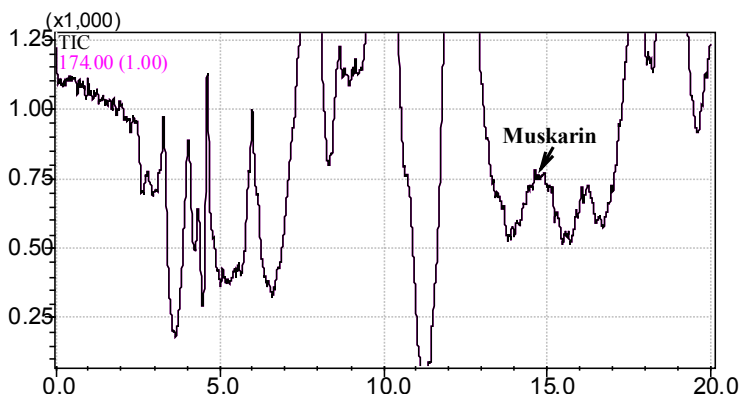
Obr. 33: Hmotnostní spektrum muskarinu.



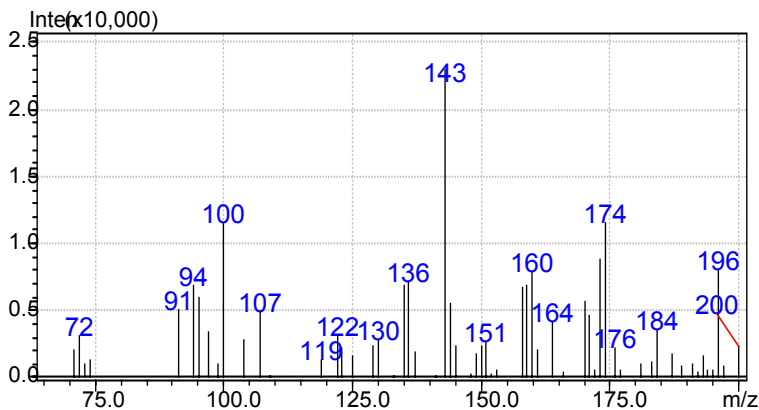
Obr. 34: Chromatografický záznam extraktu žaludečního obsahu pacientky (MF: 8 mmol.l⁻¹ heptafluoromáselná kyselina).

Případ č. 3

V tomto případě šlo o 28 letou ženu, která požíla muchomůrku tygrovanou. U pacientky byla odebrána moč a žaludeční obsah. V moči bylo metodou LC/MS prokázáno stopové množství muskarinu. Žaludeční obsah byl na přítomnost muskarinu negativní. Chromatografický záznam moče pacientky po extrakci a hmotnostní spektrum muskarinu je zobrazeno na obrázcích 35 a 36.



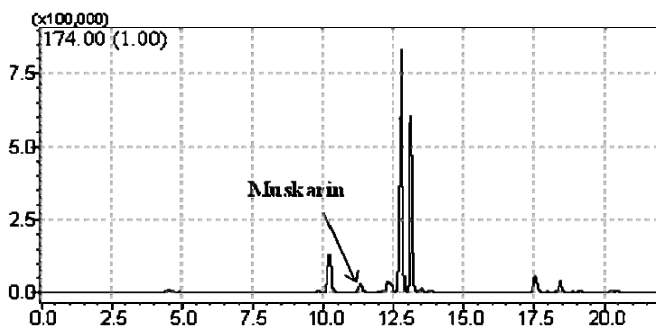
Obr. 35: Chromatografický záznam moče pacientky po SPE (MF: 8 mmol.l⁻¹ heptafluoromáselná kyselina).



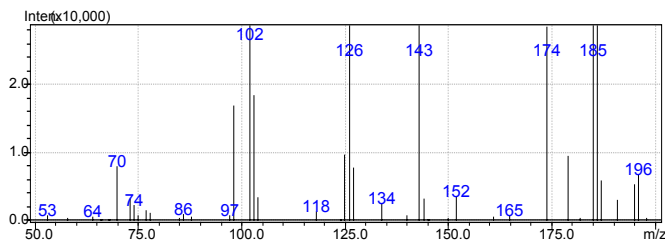
Obr. 36: Hmotnostní spektrum muskarinu.

Případ č. 4

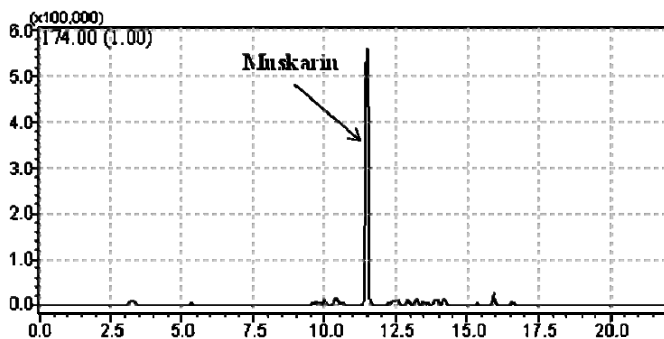
V tomto případě se jednalo o 26 letého muže, který si přes internet objednal tzv. „magic mushrooms“. Na párty snědl 6 kusů těchto hub. Později si šel lehnout. O hodinu později byl přáteli nalezen v bezvědomí. Při příjezdu rychlé záchranné služby měl muž již zástavu srdce. Přes veškeré snahy lékařů pacient umírá. Krev byla odebrána ještě za živa pacienta. Moč a žaludeční obsah pacienta byly odebrány při pitvě. V moči a žaludečním obsahu pacienta byl prokázán muskarin. Sérum bylo zpracováno metodou SPE přes Hybrid SPE kolonku (str. 46). Rovněž v séru byla potvrzena přítomnost muskarinu. Chromatografické záznamy moče, žaludečního obsahu a séra pacienta po extrakci a hmotnostní spektra muskarinu jsou zobrazena na obrázcích 37 – 42.



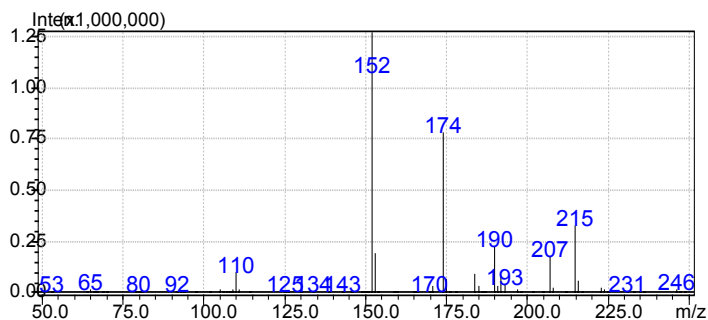
Obr. 37: Chromatografický záznam moče pacienta po SPE (MFA: 8 mmol.l⁻¹ heptafluoromáselná kyselina, MFB: acetonitril).



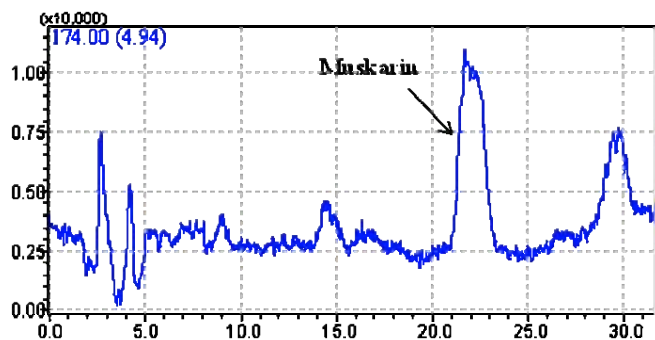
Obr. 38: Hmotnostní spektrum muskarinu.



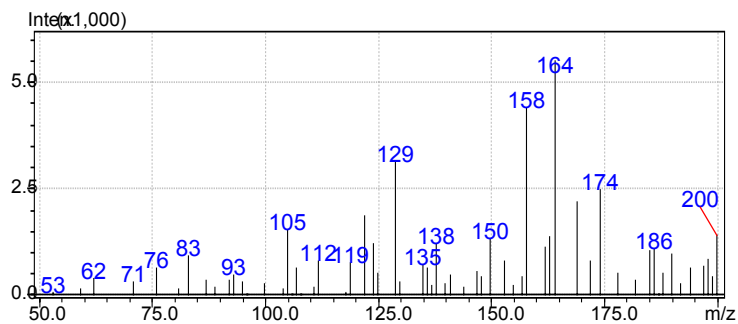
Obr. 39: Chromatografický záznam žaludečního obsahu pacienta po SPE
(MFA: 8 mmol.l⁻¹ heptafluoromáselná kyselina, MFB: acetonitril).



Obr. 40: Hmotnostní spektrum muskarinu.

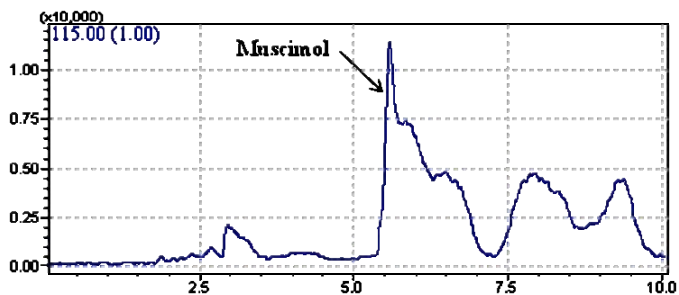


Obr. 41: Chromatografický záznam séra pacienta po SPE (MF: 8 mmol/l kyselina heptafluoromáselná).

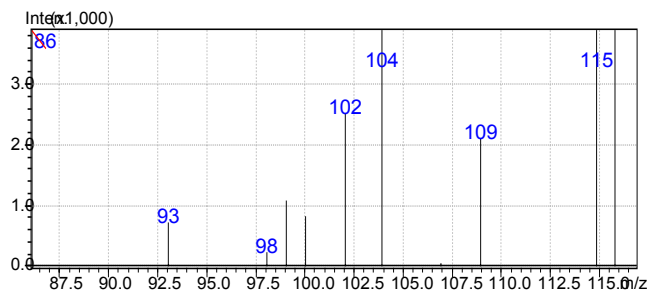


Obr. 42: Hmotnostní spektrum muskarinu.

V séru tohoto pacienta byla rovněž zjištěna přítomnost muscimolu (obrázek 43 a 44).



Obr. 43: Chromatografický záznam séra pacienta po SPE.



Obr. 44: Hmotnostní spektrum muscimolu.

6. Závěr

Předložená práce byla zaměřena na vypracování postupu izolace, identifikace a popř. stanovení kyseliny ibotenové, muscimolu a muskarinu, hlavních toxinů muchomůrek červené a tygrováné z moče metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Jde o první objektivní analytickou metodu, vyvinutou pro izolaci těchto látek z moče intoxikovaných pacientů.

K identifikaci toxinů byl použit hmotnostní detektor s kvadrupólem, testovány byly dva iontové zdroje – elektrosprej a chemická ionizace za atmosférického tlaku v kladném a záporném módu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím elektrospreje v kladném módu. Pro získání fragmentačních spekter látek byla použita iontová past rovněž s elektrosprejem v kladném módu.

Podávalo se nalézt a optimalizovat podmínky separace těchto látek za použití kolony Gemini C18 a 8 mmol/l kyseliny heptafluoromáselné jako mobilní fáze. Pro extrakci daných látek z moče byla testována analytická metoda extrakce kapalina-kapalina a extrakce na pevné fázi. Nejlepších výsledků bylo dosaženo extrakcí na pevné fázi.

Testováním řady SPE kolonek bylo zjištěno, že pro extrakci muskarinu z moče je nejvhodnější použití kolonek Strata X-CW, pomocí kterých bylo dosaženo extrakční výtěžnosti muskarinu 95 %. Pro extrakci kyseliny ibotenové a muscimolu z moče bylo dosaženo nejlepších výsledků na kolonkách Discovery SCX, i když extrakční výtěžnost pro kyselinu ibotenovou byla pouze 15 % a pro muscimolu 22 %. Optimalizované extrakční postupy byly úspěšně použity k objektivní diagnostice houbových intoxikací u konkrétních pacientů. V současné době dochází k rozvoji nových analytických technik a jedním z možných řešení pro nalezení vhodnějšího izolačního postupu pro kyselinu ibotenovou a muscimol může být např. použití principu HILIC separace na kolonkách s reverzní fází nebo použití nových derivatizačních technik, které mohou být použity v kapalinové chromatografii. Dobré výsledky se dají předpokládat i při použití kolonek HybridSPE – Precipitation pro izolaci zmíněných toxinů ze séra pacientů. Použití těchto metodik je předmětem dalšího zkoumání.

Pro účely kvantitativní analýzy byla validována metoda pro stanovení muskarinu z moče. Metoda byla použita pro identifikaci a stanovení muskarinu v moči intoxikovaných osob. Touto metodou byl rovněž vyšetřen žaludečním obsah u intoxikovaných jedinců.

7. Seznam prací vztahující se k disertaci

Publikace

1. B. Merová, P. Ondra: Identification and Determination of the Toxins of *Amanita muscaria* and *Amanita pantherina*. Chemické listy **101 (S)** 2007, s. 73.
2. B. Merová, P. Ondra, M. Staňková, I. Válka: Isolation and identification of the *Amanita muscaria* and *Amanita pantherina* toxins in human urine. Neuro Endocrinol Lett **29 (5)** 2008, p. 744.
3. B. Merová, P. Ondra, M. Staňková, I. Válka: Identification and Determination of the Fly Agarics Toxins by LC-MS. Interdisciplinary Toxicology, **1 (1)** 2008, p. 98.
4. B. Merová, J. Stříbrný, P. Ondra, M. Staňková, I. Válka, Objective Diagnostic Method of Muscarine Intoxication. Interdisciplinary Toxicology, **2 (2)** 2009.
5. J. Stříbrný, M. Sokol, B. Merová, P. Ondra, Determination of ibotenic acid and muscimol in the serum and urine of a person intoxicated with *Amanita pantherina*. Interdisciplinary Toxicology, **2 (2)** 2008.
6. B. Merová, P. Ondra, M. Staňková, J. Stříbrný, L. Hebká, K. Lemr: Identification of muscarine in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry. AUPO Chemica 47S **1** 2010, p. 65.
7. P. Ondra, B. Merová, M. Staňková, J. Stříbrný: Liquid chromatography-mass spectrometry: an objective and fast diagnostic method for the *Amanita muscaria* and *Amanita pantherina* intoxication. Toxichem Krimtech **77 (3)** 2010, p. 214.
8. B. Merová, P. Ondra, M. Staňková, M. Soural, J. Stříbrný, L. Hebká, K. Lemr: Determination of muscarine in human urine by electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric. Journal of Chromatography B **879 (25)** 2011, p. 2549.

9. J. Stříbrný, M. Sokol, B. Merová, P. Ondra: GC/MS determination of ibotenic acid and muscimol in the urine of patients intoxicated with *Amanita pantherina*. International Journal of Legal Medicine, Jul **13** 2011.
10. B. Merová, M. Staňková, J. Stříbrný, P. Ondra: LC-MS: objektivní metoda diagnostiky intoxikací muchomůrkami – v recenzním řízení.

Prezentace

1. B. Merová, P. Ondra: Možnosti průkazu a stanovení obsahových látek muchomůrek červené a tygrované. *12. Mezioborová česko-slovenská toxikologická konference TOXCON 2007*, 11. – 13.6.2007, Praha, Česká republika.
2. B. Merová, P. Ondra: LC-MS metoda průkazu a stanovení účinných látek muchomůrek červené a tygrované. *IV. Kormanove martinské súdnolekárske dni*, 4. – 5.10.2007, Martin, Slovenská Republika.
3. B. Merová, P. Ondra, M. Staňková, I. Válka: Identification and Determination of the Fly Agarics Toxins by LC-MS. *13. Interdisciplinary Toxicology Conference TOXCON 2008*, 27. – 30.5.2008, Trenčianské Teplice, Slovenská Republika.
4. B. Merová, P. Ondra, M. Staňková, I. Válka: *Amanita muscaria* and *Amanita pantherina* – Identification and Determination of the Selected Toxins by LC-MS. *1st Slovak – Czech Scientific Congress of Forensic Medicine*, 18. – 21.6.2008, Gabčíkovo, Slovenská Republika.
5. P. Ondra, B. Merová: Nejčastěji zneužívané látky z pohledu analytického toxikologa. *Nitranské súdnôlekárske dni*, 12. – 14.11.2008, Nitra, Slovenská Republika.
6. B. Merová, J. Stříbrný, P. Ondra, M. Staňková, I. Válka: Objective Diagnostic Method of Muscarine Intoxication. *14. Interdisciplinary Toxicology Conference TOXCON 2009*, 3. – 5.6.2009, Brno, Česká Republika.
7. J. Stříbrný, M. Sokol, B. Merová, P. Ondra: Determination of ibotenic acid and muscimol in the serum and urine of a person intoxicated with *Amanita pantherina*. *14. Interdisciplinary Toxicology Conference TOXCON 2009*, 3. – 5.6.2009, Brno, Česká Republika.

8. B. Merová, M. Staňková, J. Stříbrný, P. Ondra: Možnosti toxikologické laboratoře v diagnostice houbových intoxikací. *Ostravské dny forenzních věd*, 7.-9.10. 2009, Ostravice, Česká Republika.
9. B. Merová, P. Ondra, M. Staňková, J. Stříbrný, L. Hebká, K. Lemr: Identification of muscarine in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry. *CHIRANAL 2010*, 8. - 11.2.2010- Olomouc, ČR.
10. P. Ondra, B. Merová, M. Staňková, J. Stříbrný: Liquid chromatography-mass spectrometry: an objective and fast diagnostic method for the *Amanita muscaria* and *Amanita pantherina* intoxication. *48th meeting of The International Association of Forensic toxicologists*, 29.8. - 2.9. 2010, Bonn, Německo,. Publikováno v recenzovaném časopise *Toxichem Krimtech* 77 (3) 2010, p. 214.
11. P. Ondra, B. Merová, M. Staňková, J. Stříbrný: LC-MS: metoda objektivní diagnostiky intoxikací muchomůrkami. *12. česká konference klinické farmakologie*, 13. - 16.10. 2010, České Budějovice, ČR.
12. B. Merová, M. Staňková, J. Stříbrný, P. Ondra: Možnosti laboratorní diagnostiky intoxikací houbami z rodu *Amanita*. *Ostravské toxikologické dny*, 11. – 13. 5. 2011, Trojanovice, ČR.

8. Ostatní práce

Publikace

1. B. Merová, M. Staňková, P. Ondra, J. Stříbrný: Possibilities of the Separation and the Capture of *Amanita phalloides* Toxins in Biological Materials by LC-MS Method. *Interdisciplinary Toxicology*, **3 (3)** 2010, p. A66.

Prezentace

1. Mahrová, L. Šnajderová, L. Koutská, H. Kučerová, B. Merová: Nejvýznamnější hepatotoxické látky z pohledu analytické toxikologie. *Moravský hepatologický den*, 5.9.2008, Olomouc, Česká republika.
2. J. Stříbrný, B. Merová, L. Macháčková, D. Kreisingerová: Přírodní halucinogeny. *Odborná konference zdravotních laborantů, ÚVN Praha*, 23.9.2008, Praha, Česká republika.
3. I. Mahrová, L. Šnajderová, L. Koutská, H. Kučerová, B. Merová: Nejvýznamnější hepatotoxické látky. *Celostátní pracovní konference*, 30.10.2008, Olomouc, Česká republika.
4. B. Merová, M. Staňková, P. Ondra, J. Stříbrný: Possibilities of the Separation and the Capture of *Amanita phalloides* Toxins in Biological Materials by LC-MS Method. *15th Interdisciplinary Toxicological Conference*, 6. - 10.9. 2010, Stará Lesná, SR.

-
5. M. Staňková, B. Merová: Možnosti zachytu toxinů muchomůrky zelené metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS a LC-MS-IT-TOF). *Mezinárodní kongres forenzních věd*, 8. - 10.9. 2010, Zámek Valtice, ČR.

 6. M. Staňková, B. Merová, P. Ondra: Diagnostika otrav houbami metodou LC-MS – kazuistiky. *XVIII. Ostravské dny forenzních věd*, 6. - 8.10. 2010, Ostravice, ČR.

9. Citace

1. S. Schonwald, v: R. C. Dart (Ed), *Medical toxicology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2004, p. 1719.
2. L. Jahodář, v: L. Houdek (Ed), *Přírodní toxiny a jedy*, Galén, Praha, 2004, p. 109.
3. A. T. Tu v: L. W. Chang, R. S. Dyer (Eds), *Handbook of Neurotoxicology*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1995, p. 557.
4. A. Scotti de Carolis, F. Lipparini, V. G. Longo, *Psychopharmacologia* 15 (1969) 186.
5. M. Brvar, M. Možina, M. Bunc, *Wien Klin Wochenschr* 118 (2006) 294.
6. L. Satora, D. Pach, K. Ciszowski, L. Winnik, *Toxicon* 47 (2006) 605.
7. L. Satora, D. Pach, B. Butryn, P. Hydzik, B. Balicka-Slusarczyk, *Toxicon* 45 (2005) 941.
8. A. M. Watanabe, B. B. Katzung, v: B. G. Katzung (Ed), *Základní a klinická farmakologie*, H & H, Brno, 1992, p. 83.
9. P. J. Fraser, *Brit. J. Pharmacol* 12 (1957).
10. M. Smotlacha, J. Erhart, M. Erhartová, *Houbařský atlas*, Trojan Brno, 1999.
11. F. Vorel, *Soudní lékařství*, Grada Publishing, Praha, 1999.
12. K. F. Lampe, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 19 (1979).
13. R. E. Schultes, A. Hofman, *Rostliny bohů*, Volvox Globator, Praha, 1996.
14. C. Heinrich, *Magické houby v náboženství a alchymii*, Triton, Praha, 2006.
15. Y. Konda, H. Takahashi, M. Onda, *Chem. Pharm. Bull.* 33 (1985) 1083.
16. K. Bowden, A. C. Drysdale, *Tetrahedron Lett.* 12 (1965) 727.
17. J. K. Brown, M. H. Malone, D. E. Stuntz, V. E. Tyler Jr., *J. Pharmac. Sci.* 51 (1962) 853.
18. S. E. Unger, A. Vincze, R. G. Cooks, R. Christmas, L. D. Rothman, *Anal. Chem.* 53 (1981) 976.
19. J. Erhart, M. Erhartová, A. Příhoda, *Houby ve fotografii*, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1977.
20. V. Antonín, B. Hlůza, *Acta Musei Moraviae Scientiae Naturales*, 72 (1987).
21. H. E. Laux, *Jedlé houby a jejich jedovatí dvojníci*, Víkend, Český Těšín, 2006.

22. V. Antonín, B. Hlůza, *Acta Musei Moraviae*, 70 (1985).
23. D. Michelot, L. M. Melendez-Howell, *Mycol. Res.* 107 (2003) 131.
24. P. W. Borthwick, E. G. Steward, *J. Molec. Struct.* 33 (1976) 141.
25. L. B. Kier, *Experientia* 26 (1970) 988.
26. G. A. R. Johnston, D. R. Curtis, W. C. de Groat, A. W. Duggan, *Biochem. Pharmacol.* 17 (1968) 2488.
27. J. Ott, P. S. Wheaton, W. S. Chilton, *Physiol. Chem. a Physics* 7 (1975) 381.
28. Zhong Jin, *Nat.Prod. Rep* 20 (2003) 584.
29. H. Corrodi, E. Hardegger, F. Kögl, *Helv. Chim. Acta* 40 (1957) 2454.
30. H. Fritz, A. R. Gagneux, R. Zbinden, C. H. Eugster, *Tetrahedron Lett.*, 25 (1965) 2075.
31. S. Senoh, S. Imamoto, Y. Maeno, T. Tokuyama et al., *Tetrahedron Lett.*, 46 (1964) 3431.
32. W. S. Chilton, C. P. Hsu, W. T. Zybak, *Phytochemistry*, 13 (1974) 1179.
33. H. Musso, *Tetrahedron Lett.* 33 (1979) 2843.
34. P. Catalfomo, V. E. Tyler Jr., *J. Pharmac. Sci.* 50 (1961) 8.
35. M. Onda, H. Fukushima, M. Akagawa, *Chem. Pharm. Bull.* 12 (1964) 751.
36. H. Döpp, H. Musso, *Chem. Ber.*, 106 (1973) 3473.
37. www.enpsyro.cz
38. R. G. Benedict, V. E. Tyler, L. R. Brady, *Lloyda* 29 (1966).
39. T. Stijve, *Mitt Geb Lebensmittelunters Hyg* 72 (1981).
40. U. Lund, *Archiv for Pharmaceutical Organic Chemistry, Scientific Edition* 7 (1979).
41. S. Komiyama, Y. Yamaura, H. Nakazawa, M. Fujita et al, *Bunsiki Kagaku* 34 (1985).
42. M. C. Gennaro, D. Giacosa, E. Gioannini, S. Angelino, *J. Liq. Chrom. a Rel. Technol.*, 20 (1997) 3.
43. K. Tsunoda, N. Inoue, Y. Aoyag, T. Sugahara, *Shokuhin Eiseigaku Zassi* 34 (1993).
44. F. C. Størmer, G. E. B. Koller, K. Janak, *Mycologist*, 18 (2004) 114.
45. K. Tsujikawa, K. Kuwayama, H. Miyaguchi, T. Kanamori et al, *J. Chromatogr.B Analyt Technol Biomed Life Sci* 852 (2007) 430.
46. M. Deveaux, M. Chêze, R. Courtecuisse, G. Pépin, *TIAFT Korea* (2005)

-
47. D. B. Repke, D. T. Leslie, N. G. Kish, J. Pharmac. Sci. 67 (1978) 485.
48. K. Tsujikawa, H. Mohri, K. Kuwayama, H. Miyaguchi, Forensic Sci Internat 164 (2006) 172.
49. J. Stříbrný, M. Sokol, B. Merová, P. Ondra, TOXCON Brno (2009).