

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra analytickej chémie

**Využití derivatizačních reakcí ke zvýšení
ionizačního výtěžku amanitinů při ESI/MS analýze**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:

Bc. Paula Rovňáková

Študijný odbor:

Analytická chémie

Vedúci práce:

doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

2018 Olomouc

Bibliografická identifikácia:

Meno a priezvisko autora: Bc. Paula Rovňáková

Názov práce: Využití derivatizačních reakcí ke zvýšení ionizačního výtěžku amanitinů při ESI/MS analýze

Typ práce: diplomová

Pracoviško: Katedra analytickej chémie

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

Rok odovzdania práce: 2018

Abstrakt:

Táto práca sa zameriava na stanovenie amanitínov. V teoretickej časti sú popísané hubové toxíny, a to konkrétne alfa a beta-amanitín, intoxikácie hubovými toxínmi, existujúce metódy stanovenia amanitínov a taktiež derivatizačné reakcie. Experimentálna časť je zameraná na úpravu vzoriek s použitím vhodných rozpúšťadiel, postup derivatizácie a nastavenie parametrov merania v systéme UHPLC-MS/MS. Cieľom práce bolo zlepšenie podmienok pre detekciu alfa alebo beta-amanitínu v pripravených vzorkách metódou UHPLC-MS/MS. Súčasťou optimalizácie metódy bola úprava vzoriek derivatizáciou dansyl chloridom za účelom zvýšenia signálu vzorky pri meraní. Dansylované vzorky boli ďalej alkylované (methylované), čo z nich robí permanentné katióny a tým ďalej zvyšuje účinnosť ionizácie analytov. V rámci práce bol vytvorený protokol pre dansyláciu a následnú metyláciu beta-amanitínu a bola porovnaná odozva obidvoch derivátov v MS/MS.

Kľúčové slová: UHPLC-MS, amanitín, huby, derivatizácia, dansyl chlorid, alkylácia, MRM

Počet strán: 66

Počet príloh: 0

Jazyk: SK

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Paula Rovňáková
Title: Use of derivatization reactions for improvement of ionization yield of amanitins in ESI/MS
Type of thesis: Master's
Department: Department of Analytical Chemistry
Supervisor: Doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.
The year of submission: 2018

Abstract:

This diploma thesis deals with determination of amanitins. Theoretical part of this thesis describes fungal toxins, alpha and beta-amanitin, intoxications, various methods of determination of amanitins and derivatization reactions. Experimental part of the thesis aims at preparation of samples using appropriate solvents, process of derivatization and setting of measurement parameters in the UHPLC-MS/MS. The aim of the work was to improve conditions for the detection of alpha and beta-amanitin in prepared samples by UHPLC-MS/MS. A part of the method optimization was the preparation of samples by derivatization with dansyl chloride to increase signal of the measurement. The dansylated samples were further alkylated (methylated) which make them permanent cations and they enhance the ionization efficiency of the analytes. Within the frame of work, a protocol for dansylation and subsequent methylation of beta-amanite was made and was compared of the response of both derivatives in MS / MS.

Keywords: UHPLC-MS, amanitin, mushrooms, derivatization, dansyl chloride, alkylation, MRM
Number of pages: 66
Number of appendices: 0
Language: SK

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

Súhlasím s tým, aby moja práca bola sprístupnená v knižnici Katedry analytickej chémie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačnom systéme Univerzity Palackého v Olomouci

V Olomouci dňa 20.4.2018

.....

Podpis

Pod'akovanie

Chcela by som pod'akovať doc. RNDr. Petrovi Fryčákovi, Ph.D. za odborné vedenie tejto práce, cenné rady a čas, ktorý mi venoval. Taktiež by som chcela pod'akovať RNDr. Ondrovi Kurkovi Ph.D. za jeho rady a pomoc pri práci v laboratóriu a spracovaní práce.

OBSAH

1	ÚVOD	12
2	TEORETICKÁ ČASŤ	13
2.1	Jedovaté huby	13
2.1.1	Muchotrávka zelená	14
2.2	Hubové toxíny	15
2.2.1	Alfa a beta-amanitín	17
2.3	Intoxikácia hubami a stanovenie hubových toxínov	18
2.3.1	RIA	19
2.3.2	ELISA	19
2.3.3	CZE	20
2.3.4	TLC	21
2.3.5	HPLC/UV, HPLC/EC	21
2.3.6	HPLC/MS	26
2.4	Derivatizačné reakcie	32
2.4.1	Činidlá pre derivatizáciu alkoholových a fenolických -OH skupin	33
2.4.2	Dansylácia	36
2.4.3	Methylácia	38
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	39
3.1	Použité chemikálie a prístroje	39
3.2	Parametre merania	39
3.3	Príprava vzorky	41
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	43
4.1	Postupy merania	43
4.1.1	Meranie s použitím pyridínu	44
4.2	Optimálny postup pre prípravu alkyl-dansyl-beta amanitín	46

4.2.1	Chromatografická analýza reakčnej zmesi metylovaného derivátu s použitím metyl jodidu.....	46
4.2.2	Chromatografická analýza reakčnej zmesi oktadecylovaného derivátu	48
4.2.3	Porovnanie metylovanej a oktadecylovanej vzorky	50
4.3	Príprava vzoriek alfa a beta-amanitínu pre MS, MS/MS, MRM a SIR meranie	51
4.3.1	Alfa-amanitín	52
4.3.2	Analýza vzorky beta-amanitínu	52
4.3.3	Meranie rozdielov odozvy jednotlivých derivátov beta-amanitínu.....	59
5	ZÁVER	62
6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	63

Zoznam použitých skratiek:

42PPsulfonylCL	(4-(2-pyridiloxyl)phenyl) sulfonyl chlorid hydrochlorid
CE	collision energy (kolízna energia)
CV	capillary voltage (napätie kapiláry)
CZE	capillary zone electrophoresis (kapilárna zónová elektroforéza)
DAD	diode-array detector (detektor diódového poľa)
DanAa	dansylovaný alfa-amanitín
DanAb	dansylovaný beta-amanitín
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	electrospray ionization (ionizácia elektrosprejom)
FFA	free fatty acids (voľné mastné kyseliny)
FM	focus mode
HPLC	high-performance liquid chromatography (vysokoúčinná kvapalinová chromatografia)
(HR)-MS/MS	high-resolution tandem mass spectrometry (tandemová hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením)
IAE-LC-MS	immunoaffinity extraction-liquid chromatography with mass detection (imunoafinitná extrakcia-kvapalinová chromatografia s hmotnostnou detekciou)
IS	internal standard (vnútorný štandard)
ISD	in situ derivatization (derivatizácia na mieste) RIA radioimmunoassay (radioimunologický test)
LD50	lethal dose (smrteľná dávka)
LLE	liquid-liquid extraction (extrakcia kvapalina-kvapalina)
LOD	limit of detection (limit detekcie)

LOQ	limit of quantification (limit kvantifikácie)
MeDanAb	methylovaný dansylovaný beta-amanitín
OcdDanAb	oktadecylovaný dansylovaný beta-amanitín
POP	prolyl oligopeptidáza
PQEM	pseudo quick elute mode (pseudo rýchly elučný mód)
QEM	quick elute mode (rýchly elučný mód)
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
SPE	solid phase extraction (extrakcia tuhou fázou)
TLC	tin layer chromatography (tenkovrstvá chromatografia)
TOF	time of flight (analyzátor doby letu)

Zoznam tabuliek:

Tab. I: LOD a LOQ hodnoty 5% kyseliny chloristej, vzoriek pečene a obličiek [32]	24
Tab. II: Regresné dáta [33]	25
Tab. III: Presnosť a správnosť analýzy mykotoxínov v sére a moči [33].....	25
Tab. IV: Validáčné dáta a LOD pre FFA [41]	38
Tab. V: Parametre merania pre MRM DanAb.....	40
Tab. VI: Parametre merania pre MRM MeDanAb	40
Tab. VII: Parametre merania pre MRM OcdDanAb	40
Tab. VIII: Parametre merania MS/MS MeDanAb.....	41
Tab. IX: Profil gradientu mobilnej fáze.....	41
Tab. X: Priemerné retenčné časy MeDanAb, DanAb.....	47
Tab. XI: V tabuľke sú zobrazené hodnoty plochy píkov dansylovaného, methyl dansylovaného beta-amanitínu a pomer ich plôch.....	48
Tab. XII.: Priemerné retenčné časy OcdDanAb, DanAb.....	49
Tab. XIII: V tabuľke sú zobrazené hodnoty plochy píkov dansylovaného, oktadecyl dansylovaného beta-amanitínu a pomer ich plôch.....	50
Tab. XIV: Plochy píkov merania MRM pri rôznych kolíznych energiách	54
Tab. XV: Plochy píkov merania MRM pri rôznom napätí kapiláry	54
Tab. XVI: Plochy píkov merania MRM pri rôznom napätí kónusu	55
Tab. XVII: Plochy píkov merania MRM pri rôznych kolíznych energiách	56
Tab. XVIII: Plochy píkov merania MRM pri rôznom napätí kapilári	56
Tab. XIX: Plochy píkov merania MRM pri rôznom napätí kónusu	57
Tab. XX: Plochy píkov merania MRM pri rôznych kolíznych energiách.....	58
Tab. XXI: Plochy píkov merania MRM pri rôznom napätí kapilári	58
Tab. XXII: Plochy píkov merania MRM pri rôznom napätí kónusu.....	59
Tab. XXIII: Meranie odozvy vzoriek DanAb a MeDanAb	60
Tab XXV: Meranie odozvy vzoriek DanAb a OcdDanAb.....	60

Zoznam obrázkov:

Obr. 1: Muchotrávka zelená [7].....	15
Obr. 2: Alfa a beta-amanitín [15].....	18
Obr. 3: Hmotnostné spektrá a fragmentácia alfa a beta-amanitínu [35].....	29
Obr. 4: Zväčšené profily protónovaných molekulových iónov a ich izotopových píkov získaných pomocou ESI s vysokou rozlišovacou schopnosťou jednostupňovým TOF MS [36].....	31
Obr. 5: Umiestnenie derivatizácie v LC [37].....	33
Obr. 6: Derivatizačné reakcie hydroxylových funkčných skupín s acylchloridmi (a), organickými anhydridmi (b) a izokyanátmi (c) [39]	36
Obr. 7: Reakčné schémy (A) syntézy izotopového značeného činidla dansyl chloridu $^{13}\text{C}_2$ a (B) dansylácia [40].....	37
Obr. 8: Chromatogramy zobrazujúce píky s rovnakým m/z 266, a) v prípade metylovaného hydrolyzovaného dansylu a b) v prípade methylesteru dansylu.....	45
Obr. 9: SIR chromatogram MeDanAb a DanAb po 10 minútovom zahrievaní	47
Obr. 10: SIR chromatogram po 10 minútovom zahrievaní vzorky a) OcdDanAb odpovedal m/z 1405,7 a b) DanAb odpovedal m/z 1153,4	49
Obr. 11: SIR chromatogram MeDanAb a DanAb + OcdDanAb a DanAb po 10 minútovom zahrievaní.....	51
Obr. 12: Namerané chromatogramy vzorky MeDanAa.....	52
Obr. 13: MSMS spektrum píku m/z 1167,4 zo vzorky MeDanAb pri kolíznych energiách 30, resp. 40 eV.	53

1 ÚVOD

Huby sú od pradávna jednou z častých zložiek ľudskej potravy. Taktiež aj v dnešnej dobe je ich konzumácia veľmi bežná. Veľa ľudí si pri zbere húb zvykne jedlé huby zameniť s jedovatými. Je to najmä v dôsledku nedostatočných znalostí a taktiež veľkej podobnosti medzi jedlými a jedovatými hubami. Medzi jedny z najviac jedovatých húb patrí aj muchotrávka zelená. Táto huba obsahuje nebezpečný toxín amanitín, ktorý dokáže zabiť človeka vo veľmi krátkej dobe. Avšak otrava jedovatými hubami neznamená hneď smrť. Existuje veľa spôsobov ako túto otravu vyliečiť. Dôležitá je však včasná identifikácia jedovatej huby a stanovenie primeranej liečby. V dôsledku toho sa vyvíjajú rôzne metódy na stanovenie hubových toxínov. Je nutné aby vyvinuté metódy boli dostatočne citlivé aj na veľmi nízke koncentrácie a rýchle, aby sa zabránilo poškodeniu orgánov a nebola nutná ich transplantácia (týkajúca sa najmä pečene). Táto práca je zameraná na optimalizáciu podmienok UHPLC-ESI-MS/MS analýzy amanitinov po ich derivatizácii zameranej na zvýšenie citlivosti detektora na tento typ látok..

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Jedovaté huby

Medzi tisíckami druhov húb na celom svete, len menej ako sto je jedovatých. Väčšina hubových toxínov spôsobuje miernu alebo strednú otravu, iba 15-20 druhov jedovatých húb je po požití smrteľných. Požitie niekoľkých druhov extrémne jedovatých húb spôsobuje vážne otravy. Najobávanejšie otravy spôsobujú cytotoxické huby, ktoré poškodzujú bunkové štruktúry. Medzi ne patria napr. huby obsahujúce amatoxíny - muchotrávka zelená (*Amanita phalloides*), muchotrávka končistá (*Amanita virosa*) a muchotrávka biela (*Amanita verna*). Ďalším cytotoxickým jedom je napr. orellanín, ktorý sa vyskytuje napr. u druhu *Cortinarius* a môže vyvolať ťažké a pretrvávajúce poškodenie obličiek. Ťažké, ale zriedka smrteľné účinky sú spôsobené hubami obsahujúcimi neurotoxíny, ako sú muskarín (u druhu *Clitocybe a Inocybe*), psilocybín (u druhu *Psilocybe a Panaeolus*), isoxazol (*Amanita muscaria, Amanita pantherina*) a gyromitrin (u druhu *Gyromitra*). [1][2].

Otravy z húb možno rozdeliť na otravy, ktoré nie sú život ohrozujúce, (príznaky začínajú počas 6 hodín po konzumácii húb) a život ohrozujúce otravy (s oneskoreným nástupom príznakov, ktoré začínajú po 6 hodinách po požití). Toxíny v skupine so skorým nástupom zahŕňajú napr. muskarín, muscinol a kyselinu ibotenovú. Medzi toxíny, ktoré sú v skupine s oneskoreným nástupom, patria amanitíny, orellanín a gyromitrín. Amanitín spôsobuje gastroenteritídu a poškodenie pečene, orellanín poškodenie buniek obličiek, na ktoré sa viaže a gyromitrín patrí medzi karcinogénne látky a spôsobuje ťažké otravy organizmu [1][3],[4].

Okrem klinických príznakov môže byť diagnóza otravy húb založená na identifikácii spór prítomných v materiáloch pochádzajúcich z húb. V modernej forenznej toxikológii sa často používa analýza spór z obsahu žalúdka. Ďalej sa používajú metódy ako radioimunologický test (RIA) (viď kapitola 2.3.1.) a rastúci počet nových metód zahrňujúcich chromatografickú alebo elektroforetickú separáciu [3].

Výskyt otravy hubami sa geograficky mení v závislosti od klímy, výskytu toxických húb, životného štýlu a pod. Požitie toxických húb môže byť spôsobené zamenou jedlej a jedovatej huby, nepozornosťou pri zbere húb, úmyselným požitím psychotropných húb,

náhodným požitím malými deťmi, zriedkavé sú samovražedné sklony. Zmeny v klinických účinkoch môžu závisieť na citlivosti jedinca. Dôležité je, čo najskôr otravu identifikovať, rozoznať k akej otrave došlo, aká je koncentrácia toxínov v tele a na základe týchto informácií a predpísať primeranú liečbu [1][2].

2.1.1 Muchotrávka zelená

Najjedovatejšou hubou zo všetkých muchotrávok a taktiež jednou z najjedovatejších húb v Európe je muchotrávka zelená - *Amanita phalloides*. Jej názov je podľa jednej verzie odvodený z gréckeho amanités, ktorý označuje hubu rastúcu na hore Amanus. Podľa inej verzie názov súvisí s gréckym amé, čo znamená rýľ alebo motyka a znamená to vraj zemnú hubu. Druhé meno phalloides prvý krát použil lekár a botanik z Francúzska Sebastien Vaillant. Slovenský názov tejto huby však vôbec nepoukazuje na to, aká je táto huba smrteľne jedovatá. Tak ako je nenápadný jej názov, je nenápadný aj jej vzhľad aj napriek tomu, že býva pôvodcom 90 – 98 % všetkých úmrtí, ktoré sú spôsobené jedovatými hubami [5].

Muchotrávka zelená má v počiatočnom štádiu plodnicu obalenú bielou plachtičkou, ktorá sa rastom trhá. Klobúk je veľký 60-150 mm. Najprv je zvoncovitého tvaru, neskôr úplne plochý. Jeho farba je rôzna, napr. zelenožltá, olivovo sivozelená, olivovo zelená, sivobelavá a pod. Lupene v plodnej časti sú 8-12 mm široké, husté a biele. Hlúbik je valcovitý, dlhý 50-150 mm a hrubý 10-20 mm. Zvyčajne má bielu, žltozelenkavú alebo sivastú farbu. V hornej časti sa nachádza ovisnutý biely prsteň. Dužina je bielej farby a pod pokožkou klobúka slabo žltohnedastej farby. Hubári si ju môžu spliesť napr. s plávkou zelenkastou [6].

Aj keď je muchotrávka zelená prudko jedovatá, prvé príznaky sa objavia až keď sa jed v organizme vstrebe, čo je približne po 6 až 24 hodinách po konzumácii. Akútne zlyhanie pečene sa následne vyvíja 3-4 dni po požití a pacienti zomierajú po 6-16 dňoch. Najviac citliví na amanitín sú starí ľudia a deti. Taktiež sušená muchotrávka zelená je jedovatá. Ani varením či mrazením sa jed amanitín neodstráni.

Otrava muchotrávkou zelenou patrí stále medzi možné nebezpečenstvo keďže má vysoký obsah amatoxínov (5-8 mg v 25 g tkaniva), LD50 je 0,1 mg/kg. Požitie len jednej priemernej plodnice, teda klobúka, môže spôsobiť otravu viac ako dvoch dospelých ľudí. Pri záchrane otráveného človeka je nutné vykonať výplach žalúdka a čriev, čím sa odstráni

spóry húb z tela otráveného človeka. Ak sa nevyhľadá pomoc dostatočne skoro, dochádza k zlyhaniu pečene a obličiek. Pri veľmi vážnom stave je nutné vykonať transplantáciu pečene [4],[7],[8].



Obr. 1: Muchotrávka zelená [7]

2.2 Hubové toxíny

Medzi najjedovatejšie huby patria huby druhu *Amanita*. Amatoxíny patria k najnebezpečnejším jedom v prírode. Často sa na prvý pohľad zdá, že človek, ktorý sa otrávi hubami obsahujúcimi amatoxíny, je iba chorý. Neskôr sa táto „choroba“ zlepšuje, no amatoxíny sú stále prítomné v tele a od niekoľkých dní do týždňa po požití spôsobujú smrť [9].

V súčasnosti sa za amatoxíny považuje osem zlúčenín izolovaných z muchotrávky zelenej. Významné sú najmä alfa, beta a gama-amanitín. Chemicky sa jedná o bicyklické oktapeptidy. Sú rozpustné v polárnych rozpúšťadlách, ako voda, ethanol a methanol, stabilné k enzýmom a vyšším teplotám. Sú vysoko toxické a veľké dávky môžu viesť k úmrtiu aj

napriek liečbe. Otrávení ľudia by mali dostávať veľké množstvo tekutín, ktoré by nahradilo stratu telesných tekutín pri otrave. Použitie opakovaných dávok aktívneho uhlia môže zvýšiť vylučovanie amatoxínov. U dospelých by sa mala podať počiatočná dávka aktívneho uhlia 50 gramov, po ktorej by mali nasledovať opakované dávky aktívneho uhlia a to 25 gramov každé 4 hodiny počas 3 dní. U detí sa podáva počiatočná dávka aktívneho uhlia 25 gramov a nasleduje uhlie a to 10 gramov každé 4 hodiny počas 3 dní. Pri prvých 24 až 48 hodinách sa odporúča mierne zvýšená diuréza (zvýšené močenie).

Amatoxíny inhibujú transkripciu DNA na mRNA z dôvodu blokády nukleovej RNA polymerázy II. Výsledkom je narušená syntéza proteínov a bunková smrť. Ďalšími mechanizmami sú indukcia apoptózy (programovanej bunkovej smrti), tvorba voľných radikálov kyslíka a vyčerpanie glutatiónu (podieľa sa na odstraňovaní peroxidu vodíka) v pečeni. Amatoxíny sa rýchlo absorbujú z čreva a prepravujú do pečene. Ich obsah je následne pomerne vysoký v bunkách pečene, obličiek a črevnej sliznice. Vylučovanie je hlavne obličkové, avšak významné množstvo sa vylučuje aj žľou. Prvé gastrointestinálne príznaky otravy začnú 8 až 24 hodín po požití a pretrvávajú 24 hodín alebo dlhšie. Človek je následne dehydratovaný a vyčerpaný. Znaky poškodenia pečene sa objavia počas druhého dňa. Zhoršenie funkcie obličiek sa často spočiatku objavuje v dôsledku dehydratácie a šoku. Neskorší výskyt zhoršenia funkcie obličiek je dôsledkom poškodenia vyvolaného amatoxínom. Toto všetko pravdepodobne vedie k smrti [1],[10].

Viac ako 90% otráv hubami sa pripisuje niektorým z hepatotických látok druhu *Amanita*. Rôzne druhy húb *Amanita* sa podobajú jedlým hubám, takže otravy sú zvyčajne náhodné. Huby tohto druhu obsahujú amatoxíny (amanitíny, amanin, amanullin), falotoxíny (phalloidin, phalloin, phallisin, phallacidin) a virotoxíny (viroidin, viroisin, desoxyviroidin desoxyviroisin). Za najdôležitejšie toxické zložky húb rodu *Amanita* sa považujú alfa a beta-amanitín. Rozdiel medzi nimi je, že alfa-amanitín má v jednej pozícii naviazanú amino skupinu a beta-amanitín hydroxyl (vid. Obr. 2) [4].

Minimálna smrteľná dávka amatoxínu, je u všetkých typov amanitínov 0,1 mg/kg telesnej hmotnosti (5-15 mg amatoxínu ktoré sú dostatočné na usmrtenie zdravého dospelého, obsiahne asi 15-20 sušených čiapok). Po 24-48 hodinách požití môžu u pacientov nastať gastrointestinálne príznaky, žltáčka, zlyhanie obličiek až kóma. Celková úmrtnosť sa pohybuje medzi 5 a 40 %. Včasná detekcia a stanovenie amanitínov je dôležitá, aby sa zabránilo invazívnej a drahejšej terapii, ako je transplantácia pečene. Včasná diagnóza

môže prispieť k odstráneniu jedu (viď nižšie) a k ochrane pečene pred ďalšími poškodeniami. Dôležitým materiálom pri stanovení je moč. Po 12 hodinách po požití húb sú amanitíny eliminované z plazmy, avšak detekovateľné v moči sú až do 4. dňa po požití [11].

Účinným liekom na otravu hubami je silymarín, ktorý je aktívnou zložkou mliečneho bodliaka. Bolo zistené, že pôsobí proti toxickým účinkom toxínov húb druhu *Amanita*, ak sa podá do 10 minút po požití, a ak sa podá do 24 hodín, zabraňuje smrti a znižuje poškodenie pečene. Predpokladá sa, že silymarín sa viaže na toxíny a preruší recirkuláciu amanitotoxínov prostredníctvom antioxidácie, inhibície peroxidácie lipidov a zvýšenej glukuronidácie [12].

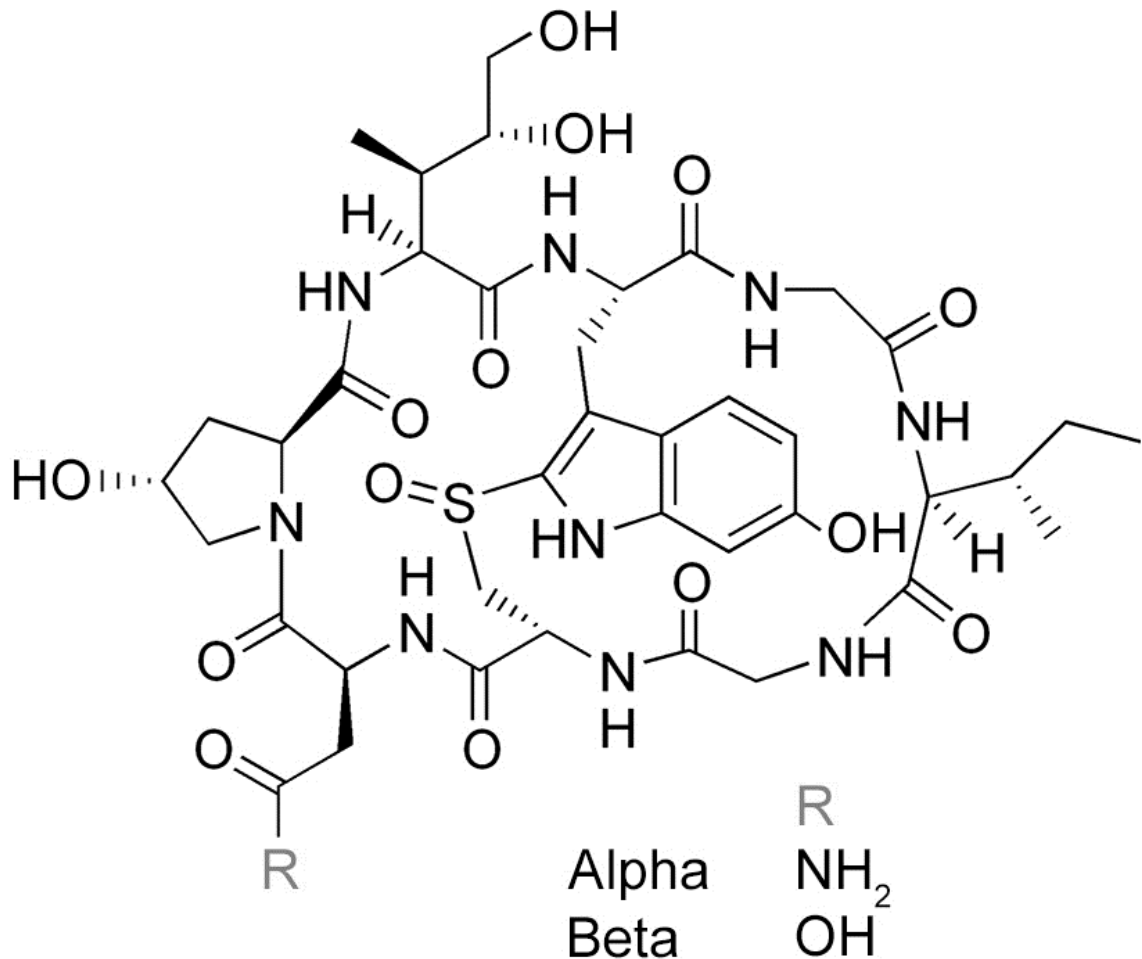
2.2.1 Alfa a beta-amanitín

Alfa a beta-amanitíny sú cyklické oktapeptidy, ktoré patria do veľkej skupiny protoplazmatických hubových toxínov známych ako amatoxíny. Líšia sa druhom substituentu v jednej pozícii (viď Obr. 2). U alfa amanitínu je v tejto pozícii naviazaná amino skupina, u beta-amanitínu hydroxyl. Huby rodu *Amanita* produkujú alfa a beta-amanitín v množstve dostatočnom na otravu dospelého človeka. Tieto amanitíny zabíjajú bunky inhibíciou RNA polymerázy II a ukončením transkripcie génov. Alfa-amanitín sa syntetizuje ako proproteín na ribozómy s dĺžkou 34 až 35 aminokyselín a potom sa štiepi na špecifických zvyškoch prolínu enzýmom prolyl oligopeptidázou (POP).

Alfa aj beta-amanitín sú schopné prejsť cez krvný obeh a dostať sa k všetkým orgánom v tele. Poškodzujú aj iné orgány, ale poškodenie pečene a srdca má smrteľné následky. Oba amanitíny sú inhibítormi eukaryotickej RNA polymerázy II a RNA polymerázy III. Toxín funguje tak, že sa viaže na premostujúcu helix RNA polymerázy II, ktorá inhibuje translokáciu RNA a DNA potrebnú na vyprázdnenie miesta pre ďalšie kolo syntézy, čím sa spomalí rýchlosť transkripcie viac ako 1000 krát. Pečeň potom nie je schopná napraviť vzniknuté poškodenie, jej bunky sa rozpadávajú a ona sama sa následne rozpúšťa.

Alfa ako aj beta-amanitín môže spôsobiť podráždenie dýchacieho traktu, bolesť hlavy, závrat, nevoľnosť, kašeľ, nespavosť, gastrointestinálne poruchy, poškodenie pečene a obličiek alebo smrť. Ak sa beta-amanitín dostane do kontaktu s pokožkou, môže spôsobiť podráždenie, popáleniny, sčervenanie a silnú bolesť. Taktiež sa môže absorbovať cez

pokožku. Pri kontakte s očami môže spôsobiť podráždenie, poleptanie rohovky a poškodenie očí [13],[14].



Obr. 2: Alfa a beta-amanitín [15]

2.3 Intoxikácia hubami a stanovenie hubových toxínov

Po perorálnom požití *Amanita phalloides* u ľudí, boli alfa a beta-amanitín detegované v plazme až do 36 hodín a v moči až do 72 hodín po požití. Čiastočne to môže byť spôsobené pomalou absorpciou v čreve, enterohepatálnou cirkuláciou a zníženou elimináciou obličiek v dôsledku nefrotoxicity. Amanitíny môžu byť dobre detegované v sére a v moči pred akýmkoľvek klinickým príznakom otravy, zatiaľ čo rutinné laboratórne testy,

ako je kompletný krvný obraz a chemický profil séra, sú nevýznamné až do poškodenia pečene alebo obličiek [16].

2.3.1 RIA

Štandardnou metódou pri stanovení amanitínov v telesných tekutinách je metóda RIA (rádioimunoanalýza) s detekčným limitom (LOD) 3 ng/ml. RIA je metóda, ktorá meria prítomnosť antigénu s veľmi vysokou citlivosťou. Je možné merať akúkoľvek biologickú látku, pre ktorú existuje špecifická protilátka, dokonca aj vo veľmi malých koncentráciách. RIA bola prvou technikou imunoanalýzy vyvinutou na analýzu nanomolárnych a pikomolárnych koncentrácií hormónov v biologických tekutinách. Pri tejto metóde sa používa rádioaktívne značenie antigénu, ktorý je naviazaný na špecifickú protilátku. Následne sa k antigénu s protilátkou pridá vzorka, napr. krvi, ktorá iniciuje kompetíciu pripraveného značeného antigénu a neznačeného antigénu zo vzorky o špecifickú protilátku. Tým sa uvoľní určité množstvo značeného antigénu, ktoré je úmerné pomeru značeného a neznačeného antigénu. Následne sa vytvorí kalibračná závislosť štandardov so známymi koncentraciami, z ktorej sa stanoví obsah antigénu vo vzorke. [17][18].

2.3.2 ELISA

Abuknesha a Maragkou použili metódu ELISA na meranie beta-amanitínu v ľudskom sére a moči. Výsledky testov v pufri, sére a moči boli pozoruhodne podobné. Limit detekcie pri tejto metóde bol približne 80 pg/ml, lineárny dynamický rozsah 80 až 2000 pg/ml. Spojenie toxínu s nosičovými proteínmi sa uskutočňovalo pomocou dvoch spojovacích metód: metóda zmiešaného anhydridu a spojenie cez mostík s kyanurchloridom. Cieľom metódy zmiešaného anhydridu bolo vytvoriť peptidové väzby medzi voľnou karboxylovou skupinou v beta-amanitíne a voľnými aminoskupinami nosných proteínov. Metóda premostenia kyanurchloridu spája amidové alebo hydroxylové skupiny s voľnými aminoskupinami v nosnom proteíne. Kľúčovým krokom, ktorý umožnil vytvorenie vysoko citlivej skúšky, bolo zavedenie nového heterológneho derivátu haptenu vyrobeného z derivátu beta-amanitín kyanurchloridu. Štúdia preukázala, že vyvinuté antisérum a postup ELISA sa môžu použiť na detekciu beta-amanitínu a príbuzných toxínov z *Amanita*

phalloides v ľudskom sére a vzoriek moču z podozrivých prípadov otravy a umožňujú skoré stanovenie liečby [19].

Butera a kol. tiež použili test ELISA na meranie amanitínov v moči. Bolo testovaných 61 pacientov a otrava amatoxínom bola diagnostikovaná v 10 prípadoch. Vzorky moču boli zhromaždené 5,5 až 92 hodín po požití jedovatej huby. Diagnostická účinnosť amanitínu bola 91,8 %, 93,4 % a 80,3 % na základe stanovenej medznej hodnoty (1,5; 5,0 a 10 ng/ml). Výhodou výsledkov počiatočného klinického hodnotenia je ich citlivosť (5 ng/ml), zatiaľčo výhodou analýz amanitínu v moči je ich špecificita [20].

2.3.3 CZE

Pre analýzu amanitínov sa používa taktiež kapilárna zónová elektroforéza (CZE). Príprava vzorky zahŕňa buď jednoduchý krok zrážania proteínov použitím rozpúšťadla rozpustného vo vode alebo zmesi rozpúšťadiel, alebo extrakciu na pevnej fáze (SPE) s reverznými alebo zmiešanými fázami. LOD v telesných tekutinách je bežne 10 ng/ml, čo je o niečo vyššie ako hodnota získaná pomocou RIA. Limit detekcie CZE je pre telesné tekutiny príliš vysoký, pretože koncentrácia amanitínu je v nich príliš nízka [21].

Bruggemann a kol. uviedli metódu na určenie alfa a beta-amanitínu v extrakte z plodov húb a v moči pomocou CZE s detekciou pomocí fotodiódového poľa. Používali fosfátový pufr a bola dosiahnutá separácia oboch amanitínov počas 20 minút s detekčným limitom 1 µg/ml. Tento limit detekcie (LOD) však leží mimo vyššie spomínaného klinického rozsahu. Výhodami CZE napr. v porovnaní s RIA, sú nižšie náklady, možnosť kvantifikácie viacerých toxínov v jednej analýze, znížená spotreba potenciálne škodlivých činidiel a čo je najdôležitejšie, testy môžu byť vykonávané v akomkoľvek štandardnom analytickom laboratóriu a v núdzových prípadoch dokonca aj „na mieste“ [22][23].

V článku Robinson-Fuentes a kol. bola vyvinutá a validovaná metóda kapilárnej zónovej elektroforézy s cieľom stanovenia alfa-amanitínu v moči za menej ako 7 minút. Bol použitý 5 mM boritanový pufr s pH 10 ako základný elektrolyt. Podmienky oddelenia boli: kapilára: 75 µm I.D., 41 cm účinná dĺžka, 48 cm celková dĺžka, teplota 25 °C, napätie 20 kV a detekcia PDA pri 214 nm. Úprava vzorky na analýzu vyžadovala len riedenie moču v základnom elektrolyte. Metóda bola validovaná podľa stanovených kritérií a bola zistená lineárnosť v rozmedzí 5-100 ng/ml. Presnosť bola v požadovaných medziach. Limit detekcie

(LOD) a limit kvantifikácie (LOQ) boli 1,5 a 5 ng/ml. Bolo analyzovaných osem vzoriek moču z podozrivých prípadov intoxikácie amanitínmi po 2 rokoch skladovania pri -20 °C a alfa-amanitín bol stanovený v dvoch vzorkách s koncentráciami 53 a 65 ng/ml. Táto opísaná metóda zahŕňa použitie neagresívnych činidiel a je to prvá metóda kapilárnej elektroforézy používaná na stanovenie amanitínov v klinických vzorkách [11].

2.3.4 TLC

Použitá môže byť taktiež chromatografia na tenkej vrstve (TLC), avšak detekčné limity pre analýzu amanitínov v telesných tekutinách sú príliš vysoké. Haines a kol. použili TLC metódu na detekciu alfa a beta-amanitínu v telesných tekutinách pacienta. Tieto výsledky TLC boli potvrdené pomocou RIA. Veľmi silná pozitívna reakcia sa získala z Meixnerovho testu. Tento test bol navrhnutý na identifikáciu prítomnosti alfa-amanitínu. Je založený na kyselej katalyzovanej reakcii amatoxínu s lignínom. Je potrebné použiť lacný celulóзовý papier, ktorý má vysoký obsah lignínu. Pozitívny Maixnerov test dáva modré sfarbenie. Pre tenkovrstvú chromatografiu boli pripravené vysušené vzorky, ktoré sa testovali s anizaldehydovým činidlom. Anizaldehydové činidlo sa používa na vizuálnu detekciu amatoxínov a falotoxínov. Výsledky boli pozitívne pre alfa-amanitín a gama-amanitín s prevažujúcim alfa-amanitínom. Beta-amanitín nebol nájdený [21][25],[26],[27].

2.3.5 HPLC/UV, HPLC/EC

Najčastejšie sa pri stanovení amatoxínov používa vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) s UV alebo elektrochemickou detekciou. Jaeger a kol. študovali kinetiku amatoxínov pri ľudských otravách. Použili HPLC s UV detekciou na analýzu toxínov v plazme, moči, gastroduodenálnej tekutine, výkaloch a tkanivách. Separácia sa uskutočnila na analytickej kolóne s obrátenými fázami za izokratických podmienok s UV detekciou pri 280 nm. Táto metóda umožňuje kvantifikáciu alfa a beta-amanitínu oddelene. Detekčný limit je 5 ng/ml pre obidva toxíny. U 28 zo 45 pacientov infikovaných *Amanita phalloides*, boli najmenej v jednej vzorke detegované amatoxíny. Amatoxíny boli častejšie detegované v moči a stolici ako v plazme. Maximálne plazmatické koncentrácie sa pohybovali medzi 8-190 ng/ml pre alfa-amanitín a 16-162 ng/ml pre beta-amanitín. U väčšiny pacientov sa amanitíny detegovali len do 36 hodín po požití. Koncentrácie v moči

boli vysoké počas 48-72 hodín po požití a potom klesli. Priemerný pomer koncentrácie moč/plazma bol 60 a 19 pre alfa, resp. beta-amanitín [21][28].

Enjalbert a kol. opísali RP-HPLC/UV-VIS metodu, ktorá umožňuje súčasné stanovenie až osem amatoxínov a falotoxínov vrátane alfa a beta-amanitínu. Extrakčná zmes, ktorá bola použitá obsahovala: methanol - voda - 0,01 M kyselina chlorovodíková (5:4:1) pretože mierne kyslé pH by malo zvyšovať stabilitu molekúl a zvýšiť výtťažok toxínov. Použitý systém HPLC stanovenia zahŕňal gradientovú elúciu so súčasným monitorovaním pri 214 a 295 nm, pretože maxima amatoxínov a falotoxínov sú v rozmedzí vlnových dĺžok 285 a 305 nm. Mobilná fáza bola zmes dvoch rozpúšťadiel a to vodný roztok octanu amónneho a acetonitrilu. Bola použitá gradientová elúcia. Úroveň detekcie bola v rozmedzí 10 ng/ml a systém bol aplikovaný na analýzu surového extraktu z *Amanita phalloides* [29].

Rieck a Platt vyvinuli metódu RP-HPLC s UV detekciou na stanovenie alfa-amanitínu a faloidínu v ľudskej plazme pomocou techniky striedania kolón. Postup je založený na obohatení toxínov na predkolóne, po ktorej nasleduje prenos obidvoch zlúčenín v režime foreflush na analytickú kolónu. Foreflush mód je bežná prevádzka chromatografickej kolóny, kedy smer toku nosiča existuje v čase, keď je vzorka zavedená do kolóny. Alfa-amanitín a faloidín je touto metódou možné spoľahlivo, rýchlo (30 minút) a citlivo (do minimálnej koncentrácie 10 ng/ml) stanoviť v plazme (relatívna smerodajná odchýlka je menej ako 10%) [30].

Citlivú metódu HPLC-EC použili Defendenti a kol. na stanovenie alfa-amanitínu v moči s limitom kvantifikácie (LOQ) 10 ng/ml. Práca popisuje optimalizáciu novej metódy extrakcie na pevnej fáze (SPE) založenej na použití jednorazových náplní s dvojitým mechanizmom (reverzná fáza/katiónová výmena) spojená s HPLC s elektrochemickou detekciou pre rýchlu analýzu moču pre alfa-amanitín. V SPE sa analyt zachytí pri pH 6, interferenty sa premyjú vodou, zriedenou kyselinou chlorovodíkovou, zmesou chloroform/methanol a analyt sa eluuje metanolom. Analytická separácia sa uskutočňuje izokratickou mobilnou fázou pozostávajúcou z fosfátového tlmivého roztoku (pH 7,2) a acetonitrilu. Lineárny dynamický rozsah bol v rozmedzí 10 – 200 ng/ml a priemerná návratnosť alfa-amanitínu 78 %. Limit detekcie štandardu alfa-amanitínu (pomer signálu k šumu 55) bol 2 ng / ml. Pre analýzu skutočných matríc bol použitý limit kvantifikácie približne 10 ng/ml (pomeru signálu k šumu 25). Validačné parametre boli získané s použitím moču pacienta s otravou. Uvedená metóda je dostatočne presná a citlivá na použitie

v reálnych prípadoch ľudskej intoxikácie *Amanita phalloides*. V porovnaní s predchádzajúcimi publikovanými metódami založenými na SPE je popísaný postup extrakcie selektívnejší a poskytuje lepšie chromatogramy. V porovnaní s metódou prepínania kolón je táto metóda jednoduchšia a nepotrebuje špecializované prístroje. Okrem toho, separačné mechanizmy HPLC s obrátenými fázami nie sú korelované s tými, na ktorých je založená RIA. Tieto dve metódy sa teda môžu úspešne použiť pre súbežné potvrdenie výsledkov. Rovnako ako pri všetkých metódach HPLC-EC, aj pri tejto existujú pri stanovení značné nevýhody. Nevýhody môžu byť napr. nedostatočná špecifita a chýbajúca dlhodobá stabilita detekcie. V núdzových prípadoch intoxikácie amanitínmi sa však na rutinnú analýzu metódy HPLC-UV a HPLC-EC nepoužívajú [22],[31].

V práci Garcia a spol. bola vyvinutá a validovaná metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s in-line pripojenou diódovou detekciou (DAD) a elektrochemickou (EC) detekciou na kvantifikáciu alfa-amanitínu v biologických vzorkách. Predbežná úprava vzorky pozostávala z jednoduchého kroku deprotonizácie s 5% kyselinou chloristou, následnej centrifugácie pri 16000 G a 4 °C počas 20 minút. Vysoká návratnosť pre alfa-amanitín ($\geq 96,8\%$) robí tento postup vhodným pre extrakciu alfa-amanitínu z pečenej a obličkových homogenátov. Výsledný supernatant bol zhromaždený a nadávkovaný do HPLC. Mobilná fáza sa skladala z 50 mM kyseliny citrónovej v 20% methanolu a 0,46 mM roztoku kyseliny oktánsulfonovej, upraveného na pH 5,5. Analýza trvala menej než 22 minút a neboli pozorované žiadne významné interferencie v retenčnom čase alfa-amanitínu. Kalibračné krivky boli lineárne s regresnými koeficientmi vyššími ako 0,994. Metóda bola lineárna v študovanom koncentračnom rozsahu, rovnako sa ukázala ako selektívna, presná a citlivá. Limit detekcie (LOD) a limit kvantifikácie (LOQ) pre amanitín upravený 5% kyselinou chloristou, vzorky pečene a obličiek sú zobrazené v Tab. I. Táto metóda má nízke interferencie a zahŕňa jednoduché a rýchle procesné kroky. Je teda vhodným postupom na podporu toxikokinetických štúdií amanitínu v živom organizme. Validovaná metóda bola úspešne použitá na kvantifikáciu alfa-amanitínu v biologických vzorkách po vnútornom podaní alfa-amanitínu potkanom. Okrem toho sa ako matrica používala ľudská plazma a určená metóda bola vhodná na detekciu alfa-amanitínu v tejto matrici [32].

Tab. I: LOD a LOQ hodnoty 5% kyseliny chloristej, vzoriek pečene a obličiek [32]

Table 4
LOD and LOQ values (expressed as $\mu\text{g mL}^{-1}$ or $\mu\text{g g}^{-1}$) computed according to different criteria.

	Perchloric acid 5% ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Liver ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Kidney ($\mu\text{g g}^{-1}$)
305 nm			
LOD			
Calibration Curve	0.150	0.110	0.160
Based on visual evaluation	0.050	0.050	0.125
LOQ			
Calibration Curve	0.450	0.330	0.500
Based on visual evaluation	0.250	0.250	0.330
Electrochemical detection			
LOD			
Calibration Curve	0.060	0.070	0.040
Based on visual evaluation	0.015	0.015	0.050
LOQ			
Calibration Curve	0.190	0.210	0.110
Based on visual evaluation	0.025	0.025	0.100

Metóda využívajúca RP-HPLC s UV detekciou bola vyvinutá pre splnenie nasledujúcich požiadaviek: súčasné stanovenie alfa, beta-amanitínu a faloidínu v sére, moči a v hubách; dostatočné rozlíšenie na odstránenie akýchkoľvek interferencií spôsobených prítomnosťou iných zlúčenín nachádzajúcich sa v matrici; metóda by mala vykazovať vysokú citlivosť a byť primerane rýchla. Stanovenie bolo zamerané na alfa a beta-amanitín, pretože tieto látky sú prítomné v relatívne veľkých množstvách (približne 80 a 50 mg/kg čerstvých húb). Okrem toho môžu byť považované za najdôležitejšie z toxínov *Amanita* kvôli ich smrteľným toxikologickým účinkom. Taktiež bol študovaný faloidín, pretože tento toxín je prítomný v najvyššom množstve (100 mg/kg čerstvých húb) a hoci jeho toxicita je nižšia, detekcia tohto toxínu v telesných tekutinách by sa mohla považovať za najdôležitejšiu indikáciu otravy *Amanita phalloides*. Boli stanovované vzorky biologických tekutín ľudského alebo živočíšneho pôvodu a taktiež bola študovaná hubová matrica. Včasná diagnostika otravy môže byť vykonaná vyšetrením nestrávených zvyškov potravín. Chromatogram pre štandardnú zmes ukázal jasné oddelenie každého mykotoxínu. Chromatogramy ľudského séra a ľudského moču, každý s prísadou štandardnej zmesi, jasne ukazujú, že elučné časy týchto troch toxínov umožňujú širokú bezpečnostnú rezervu vzhľadom na možnú interferenciu s inými látkami, ktoré môžu byť prítomné v biologickej matrici. Na kontrolu linearitu odzvy boli vytvorené kalibračné grafy výšky píku proti koncentrácii s použitím sérového riedenia štandardných roztokov každého mykotoxínu.

Zodpovedajúce regresné rovnice (Tab. II) ukazujú dobrú lineárnosť pre množstvá v rozsahu 0,5 – 20 µg/ml.

Tab. II: Regresné dáta [33]

Table 1
Regression data*

Mycotoxin	Regression equation†	r‡
α-Amanitin	$y = 184.6x - 0.112;$	0.9999
β-Amanitin	$y = 202.0x + 17.7 ;$	0.9999
Phalloidine	$y = 134.7x + 0.87 ;$	0.9999

* $n = 5$, each point representing triplicate injections in the range 0.5–20 µg/ml.

† x = concentration in µg/ml; y = peak height; 0.02 a.u.f.s.

‡ r = correlation coefficient.

V biologických tekutinách bolo najnižšie stanoviteľné množstvo pri 0,02 a.u.f.s. (absorbčná jednotka v celom rozsahu) približne 10 ng pre alfa a beta-amanitín a 5 ng pre faloidín, pre pomer signál/šum 2:1. Návratnosti alfa-amanitínu, beta-amanitínu a faloidínu zo séra a moču sú podrobne uvedené v Tab. III.

Tab. III: Presnosť a správnosť analýzy mykotoxínov v sére a moči [33]

Table 2
Accuracy and precision of analysis of mycotoxins in serum and urine

	Spiked concentration (µg/ml)									
	0.5		2.5		5		10		20	
	Recovery*	RSD†	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD
Serum										
α-Amanitin	81.1	0.91	86.2	1.05	90.1	0.70	93.2	0.71	98.1	0.76
β-Amanitin	80.6	1.42	85.5	0.69	88.7	0.58	92.6	1.19	96.0	0.81
Phalloidine	89.6	0.55	90.7	0.97	90.6	0.84	97.0	0.84	98.5	0.47
Urine										
α-Amanitin	81.1	1.08	86.6	0.69	89.4	1.04	93.2	0.74	98.0	0.49
β-Amanitin	81.0	1.21	85.3	1.08	89.2	0.78	92.5	0.93	97.3	1.00
Phalloidine	88.9	0.90	88.7	0.84	90.8	0.50	97.6	0.81	98.6	0.55

* Recovery is expressed as a percentage of the spiked concentration.

† RSD = relative standard deviation ($n = 5$).

Celkový čas analýzy vrátane postupu čistenia a chromatografie bol pri každom teste kratší ako 1 h. Takéto pomerne rýchle stanovenie je potrebné pre rýchlu diagnostiku v prípadoch podozrenia na otravu *Amanita phalloides*. Iné metódy (TLC, RIA) buď vyžadujú dlhšiu analýzu (približne 24 hodín), alebo umožňujú identifikovať len jeden z mykotoxínov. Krátky čas analýzy a výsledky ukazujú, že táto metóda je vhodná pre počiatočné rutinné vyšetrenie v klinickej praxi v prípadoch podozrenia na otravu húb [33].

2.3.6 HPLC/MS

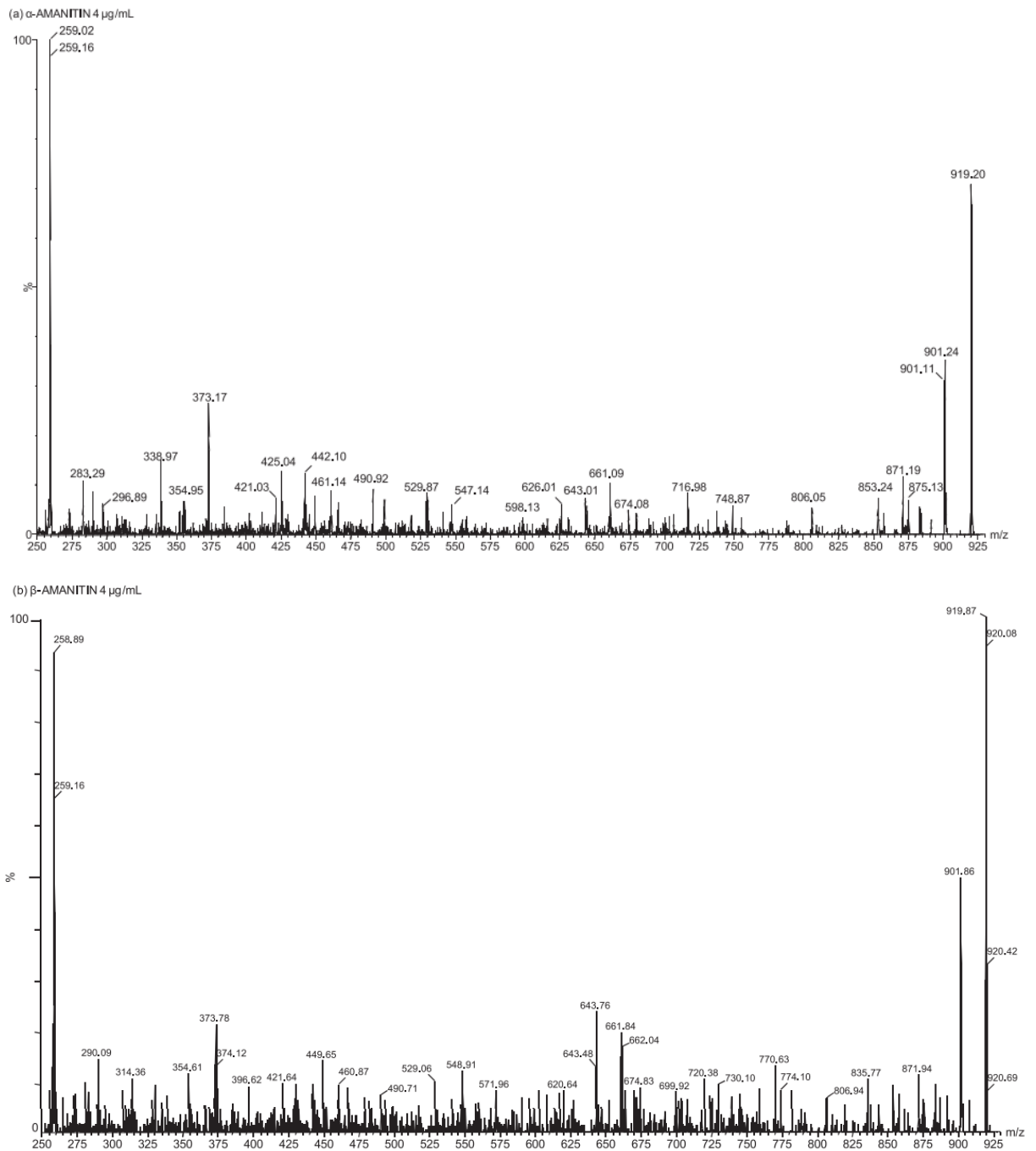
Častou metódou pre stanovenie amanitínov je tiež HPLC s hmotnostnou detekciou. Maurer a kol. vyvinuli analýzu kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou na stanovenie alfa a beta-amanitínu v moči po imunoafinitnej extrakcii (IAE-LC-MS). Kalibračné krivky pre alfa a beta-amanitín boli lineárne v rozmedzí 5-75 ng/ml. Amatoxíny v mrazených vzorkách moču a imunoafinitných extraktoch boli stabilné viac ako 6 mesiacov. Stabilita vzoriek bola testovaná pred a po uskladnení počas 6 mesiacoch pri -7 °C. IAE kolóny mohli byť použité viac ako 50 krát bez pozorovateľnej straty na výkone. LOD a LOQ pre oba boli 2,5 resp. 5 ng/ml. Tieto nízke hodnoty boli výsledkom vysokej selektivity z imunoafinitnej extrakcie, ktorá znížila vplyv matrice vzorky 100x. Návratnosť alfa a beta-amanitínu bol 63 % a 58 %. Návratnosť vnútorného štandardu metyléteru gama-amanitínu pri 25 ng/ml bol 60 %. Metóda 5 autentických vzoriek moču od pacientov intoxikovaných hubami *Amanita* ukázala dobrú zhodu medzi výsledkami RIA a analýzou pomocou IAE-LC-MS. Kompletná analýza vzoriek spolu so spracovaním vzoriek trvala 60 min, čo je o 30 minút rýchlejšie ako analýza RIA. [22].

Otravy toxínmi *Amanita phalloides* vyžadujú rýchlu diagnózu, aby sa predišlo nákladným a zbytočným terapiám. Pro tento účel je nezbytné počiatočné klinické posúdenie v kombinácii s analýzou amanitínu v moči. Preto bola vyvinutá jednoduchá, rýchla a robustná metóda spoľahlivej detekcie alfa a beta-amanitínu ako aj plne validovanej kvantifikácie alfa-amanitínu v ľudskom moči. Po jednoduchom riedení a centrifugácii vzorky moču bola prevedená rýchla on-line extrakcia pomocou systému Transcend TLX-II založeného na turbulentnej tokovej chromatografii (TurboFlow). Bol zavedený nový režim TurboFlow, režim pseudo rýchleho eluovania (PQEM), ktorého výhodou je viac možností optimalizácie metódy ako pri generickom rýchlom elučnom režime (QEM - quick elute mode). Bežne sa používa FM (focus mode) alebo QEM mód. QEM umožňuje kompletný,

postupný prenos analytov do analytického systému. Nezameriava sa však na analyty, čo môže mať za následok širšie chromatografické píky, najmä bez použitia ďalšej analytickej kolóny. FM vedie k ostrejším píkom, čo je spôsobené zameraním sa na analyty pomocou analytickej kolóny. Autori to ale vylepšili na PQEM, ktorý mal okrem generického QEM viac možností na optimalizáciu metódy. Dve čerpadlá by mohli byť súčasne prepojené so systémom, čím by sa zameriavali na analyty v porovnaní s QEM. PQEM ukázal lepšiu použiteľnosť v rutinej a núdzovej analýze ako v predtým používaných metódach. Po extrakcii, nasledovala rýchla 15 minútová analýza pomocou LC s vysokým rozlíšením (HR)-MS/MS. Táto analýza umožnila spoľahlivú identifikáciu alfa a beta-amanitínu na základe fragmentov identifikovaných pomocou takzvaných HR pseudo MS³ experimentov. Technika MS³ umožňuje izolovať a disociovať fragmenty generované zdrojom. Metóda bola úspešne aplikovaná na analýzu autentických vzoriek moču obsahujúcich amatoxíny. V porovnaní s predtým publikovanými metódami umožnila metóda TurboFlow LC-HR-MS/MS rýchle a priame použitie, nákladovo efektívnu detekciu alfa a beta-amanitínu, validované stanovenie množstva alfa-amanitínu v moči vhodnom pre toxikológiu. Pokiaľ ide o spotrebný materiál (ako je TLX kolóna), sú náklady ELISA metódy približne trojnásobné oproti popísanej metóde. Táto metóda s režimom PQEM bola popísaná a ukázaná ako výhodná oproti generickému QEM, čo vedie k automatizovanej, rýchlejšej a ľahšej príprave vzorky. Celková doba stanovenia jednej vzorky, vrátane automatizovanej extrakcie, analytickej chromatografie bola 15 minút. Je teda vhodná pre dennú rutinnú a predovšetkým núdzovú toxikologickú analýzu. Limit detekcie (LOD) a limit kvantifikácie (LOQ) boli nastavené na 1 ng/ml [34].

Štúdia Leite a spol. bola zameraná na vývoj, optimalizáciu a aplikáciu analytickej metódy ultraúčinnej kvapalinovej chromatografie s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (UPLC-MS/MS). Príprava vzoriek moču a pečene sa uskutočnila zrážaním proteínov s organickými rozpúšťadlami a extrakciou na pevnej fáze (SPE) pre stanovenie amatoxínov, alfa-amanitínu a beta-amanitínu. Boli skúmané hranice linearity, detekcie a kvantifikácie, selektivita, citlivosť, precíznosť a zotavenie v internej a medzioperačnej analýze s cieľom zaručiť spoľahlivosť analytických výsledkov. Vyvinutá metóda sa ukázala ako špecifická a selektívna s hodnotami LOD pre alfa a beta-amanitín v koncentrácii 0,22 a 0,20 ng/ml v moči a 10,9 a 9,7 ng/g v pečeni. Hodnoty LOQ sa pohybovali v rozmedzí od 0,46 do 0,57 ng/ml v moči a 12,3-14,7 ng/g v tkanive pre oba amanitíny. Linearita v rozmedzí 10,0 až 200,0 ng/ml alebo ng/g ukazuje, že koeficienty korelácie boli väčšie ako

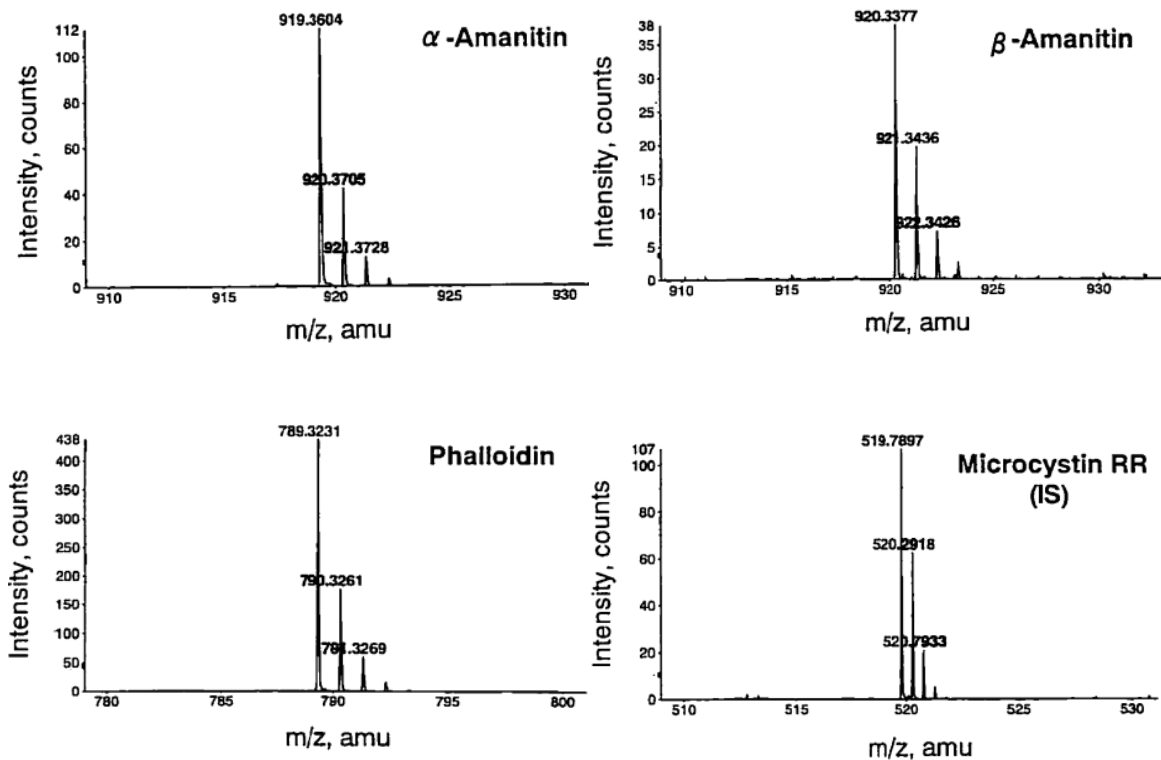
0,997 pre alfa-amanitín a 0,993 pre beta-amanitín. Precíznosť bola kontrolovaná na troch úrovniach v priebehu troch po sebe idúcich dní s intradenálnymi a medzi-dňovými variačnými koeficientmi nie väčšími ako 15,2%. Výťažok extrakcie ukazuje dobré výsledky pre analyzované koncentrácie s hodnotami v rozmedzí od 90,2 do 112,9% pre obidve matrice. V štúdiu bola navrhnutá štruktúrna charakterizácia fragmentačného modelu pre produktové ióny oboch amatoxínov. Amanitíny ako bicyklické oktapeptidy sú relatívne stabilné a produkujú $[M+H - H_2O]^+$ ako dominantné dcérske ióny v dôsledku disociácie MS/MS iónu $[M+H]^+$. Hmotnostné spektrá získané pre alfa a beta-amanitín (vid' Obr.3) poskytli píky pri pomere m/z 901 a 902, ktoré sa vytvorili dehydratáciou protonovaných iónov. Fragmentácia $[M+H]^+$ iónov v MS/MS móde tiež poskytla píky pri pomere m/z 259 pre obidva toxíny. Hmotnostný detektor v režime MRM poskytuje vynikajúcu špecifickosť umožňujúcu jednoznačnú detekciu a potvrdenie amanitínov na nízkych úrovniach v biologických matriciach. Získané hodnoty LOD a LOQ preukázali schopnosť metódy stanoviť veľmi nízke koncentrácie toxínov, ktoré sa často nachádzajú v matriciach moču a pečene. Kombinácia oboch techník umožnila rýchlejšiu a účinnejšiu separáciu so symetrickými chromatografickými píkmi, ktoré zaručujú dobré vyhodnotenie analytov a tiež možnosť získať presné meranie hmotnosti. Ako IS (vnútorrný štandard) bol použitý tilmikozín. Prezentovaná metóda ponúka zlepšenie v diagnostike a pozitívnom potvrdení intoxikácie amatoxínmi. Na Obr. 3 sú zobrazené spektrá alfa-amanitínu a beta-amanitínu namerané použitou metódou [35].



Obr. 3: Hmotnostné spektrá a fragmentácia alfa a beta-amanitínu [35]

V štúdií Ahmed a spol. bol popísaný celý postup simultánnej analýzy alfa-amanitínu, beta-amanitínu a faloidínu v toxických hubách pomocou LC-ESI-TOF MS a mikrocystínu RR ako IS. Bola použitá extrakcia rozpúšťadlom a následná SPE extrakcia. Konečný extraktový zvyšok sa rozpustil v 30 μl roztoku mobilnej fázy. Mobilná fáza pozostávala z acetonitrilu a 15% methanolu v 10 mM octane amónnom, 50:50. Nadávkovaných bolo 5 μl vzorky. Pretože koncentrácie toxínov sú v hubách dostatočne vysoké, rozsah merania

v týchto pokusoch bol stanovený na relatívne vysoké hodnoty (100 až 1000 ng/g). Okrem toho sa v počiatočnom bode použilo iba 100 mg vzorky. Citlivosť môže byť výrazne zvýšená zväčšením dávkovacieho objemu vzorky. Obr. 4 ukazuje štruktúry alfa-amanitínu (m/z 918), beta-amanitínu (m/z 919), phalloidínu (m/z 788) a IS mikrocystínu RR (m/z 1038). Mikrocystín bol vybraný ako IS pretože je to cyklický heptapeptid. Na obrázku je znázornené jednofázové spektrum TOF MS štyroch zlúčenín. Všetky spektrá obsahovali základné píky protónovaných molekulových iónov spolu s ich izotopovými píkmi. Pre IS mikrocystín RR sa protónovaný molekulárny pík objavil pri polovičnej hodnote m/z, pretože molekula bola dvojnásobne nabitá dvoma arginínovými skupinami. Pre alfa-amanitín, beta-amanitín a faloidín boli protónované molekulové píky sprevádzané píkom $[M+H - H_2O]^+$; m/z 901 pre alfa-amanitín, m/z 902 pre beta-amanitín a m/z 771 pre phaloidín. Pre mikrocystin RR nebol pozorovaný žiadny takýto pík. Detekčné limity (pomer signál/šum 3) pre alfa-amanitín, beta-amanitín a faloidín boli asi 30, 30 a 10 ng g. Výt'ážok troch toxínov pri 100, 500 a 1000 ng/g bol v rozmedzí 53,1 až 69,6%. Správnosť a presnosť pri 100, 500 a 1000 ng/g sa pohybovala od 87,9% do 117% a od 3,58% do 15,6%. Táto popísaná práca by mala byť použiteľná na meranie toxínov *Amanita* v ľudských vzorkách, ako sú moč a krv otrávených jedincov [36].



Obr. 4: Zväčšené profily protónovaných molekulových iónov a ich izotopových píkov získaných pomocou ESI s vysokou rozlišovacou schopnosťou jednotupňovým TOF MS [36]

Analýza amanitínov môže byť uskutočnená viacerými metódami, ako napr. RIA, ELISA, TLC, CZE, HPLC s UV a EC detekciu a HPLC s MS alebo s tandemovou MS detekciou. LOD pre tieto metódy bol rôzny. Väčšinou sa pohyboval v rozmedzí 3 – 5 ng/ml. Najnižšie limity detekcie mala metóda HPLC-MS a to v niektorých prípadoch len 0,2 ng/ml. Táto metóda bola tiež najrýchlejšiou metódou pri stanovení vzoriek obsahujúcich amanitíny, kde v jednej publikovanej metóde trvalo toto stanovenie len 15 minút. Podľa literatúry je teda kvapalinová chromatografia dokonalou metódou pre separáciu amanitínov. Splňa požiadavky z hľadiska citlivosti, presnosti, špecifičnosti, jednoduchosti a rýchlej detekcie alfa a beta-amanitínu v biologických vzorkách. Značný počet prác využíva LC spojené s rôznymi detekčnými metódami, ako je UV, EC či MS. Z týchto metód má najcitlivejšie a najspoľahlivejšie výsledky MS detekcia, ktorá sa v poslednej dobe aj najviac používa pre stanovenie amanitínov.

2.4 Derivatizačné reakcie

Presná a špecifická analýza cieľových molekúl v komplexných biologických matriciach zostáva významnou výzvou, najmä ak sú potrebné ultrastopové detekčné limity. Často volenou metódou pri bioanalýzach je kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou. Konvenčné metódy prípravy a čistenia vzoriek pred analýzou biologických kvapalín, ako je extrakcia kvapalina-kvapalina (LLE), extrakcia na pevnej fáze (SPE) alebo zrážanie proteínov, sú časovo náročné, zdĺhavé a môžu negatívne ovplyvniť konečný výťažok a citlivosť detekcie. Na dosiahnutie ultravysokej citlivosti v rôznych ionizačných módoch, môže byť v LC-MS použitá chemická derivatizácia. Je použitá buď online alebo offline, pred alebo za kolónou, čo je vysvetlené na Obr. 5. Cieľom chemickej derivatizácie je zmena štruktúry analytu a ovplyvnenie jeho chemických a fyzikálnych vlastností pre dosiahnutie požadovanej citlivosti. Môže byť taktiež použitá na ovplyvnenie chromatografického správania, k zlepšeniu selektivity a účinnosti separovaných analytov pred dosiahnutím MS detektora. Tým sa minimalizuje iónová supresia spôsobená interferenciami matrice. Efektívnosť extrakcie v prípade LLE a SPE môže byť zvýšená prevedením derivatizácie pred extrakciou a zakoncentrovaním analytu. Napriek všetkým výhodám je spojenie derivatizácie s LC-MS pre bioanalýzu stále obmedzené niektorými nedostatkami, ako je tvorba vedľajších produktov po derivatizácii, stabilita vytvorených derivátov, strata analytov vďaka viacstupňovej príprave vzorky a časová náročnosť. Väčšinu týchto nevýhod je možné prekonať správnym výberom a optimalizáciou derivatizačných parametrov a testovaním derivatizačného výťažku a produktov pred použitím s LC-MS. Zvýšenie počtu krokov prípravy vzorky spôsobené zavedením derivatizácie bude stále problémom. Preto hlavnou výhodou derivatizácie in situ (ISD), kde sú analyty derivatizované v ich pôvodných biologických matriciach, je to, že môže byť preskočené čistenie vzorky pred derivatizáciou a umožnené citlivé a selektívne meranie v primeranom čase.

<i>Mode</i>	<i>Reaction sequence</i>
Pre-column, offline	Derivatization away from LC– injection–separation–detection
Pre-column, online	Derivatization on the LC–injection– separation–detection
Post-column, offline	Injection–separation–derivatization away from LC–detection
Post-column, online	Injection–separation–derivatization on the LC–detection

Obr. 5: Umiestnenie derivatizácie v LC [37]

Chemické derivatizačné činidlá by mali mať dve jedinečné charakteristiky používané pri ISD. Potrebujú mať schopnosť byť pridávané vo vysokých koncentráciách bez toho, aby spôsobili významné potlačenie ionizácie a musia mať vysokú selektivitu pre cieľové analyty, aby sa umožnila úplná derivatizácia v prítomnosti iných zložiek matrice. ISD je efektívnym spôsobom zvýšenia citlivosti detekcie a zároveň umožňuje zníženie požadovaného počtu krokov prípravy vzorky v porovnaní s derivatizáciou *ex situ* (derivatizácia predtým vyčistených alebo extrahovaných analytov). Pridanie veľkého množstva derivatizačného činidla alebo predĺženie reakčného času však môže niekedy spôsobiť tvorbu vedľajších produktov. Pred LC separáciou potom môže byť vyžadovaný dodatočný krok LLE alebo SPE. Taktiež môže byť potrebné pred LC separáciou odstrániť nadbytočné činidlo, aby nedošlo k zriedeniu počas prekoncentrácie a aby sa znížila iónová supresia. Vysoká citlivosť, ktorú je možné dosiahnuť, však môže tieto nevýhody vyvážiť [37].

2.4.1 Činidlá pre derivatizáciu alkoholových a fenolických -OH skupín

Bežne sú používané derivatizačné reakcie, na zvýšenie analytického signálu, pri HPLC a CE stanovení zlúčenín s hydroxylovými funkčnými skupinami. Tieto derivatizačné reakcie sú zamerané na stanovenie zlúčenín s alifatickými alkoholmi a fenolmi s nedostatkom iných reaktívnych funkčných skupín. Na derivatizáciu môžu byť použité látky ako napr. acylchloridy, organické anhydridy, izokyanáty a ďalšie rôzne postupy zahŕňujúce oxidáciu primárnych a sekundárnych alkoholov, sulfonáciu, esterifikáciu s karboxylovými kyselinami a použitie azidov, sulfonylchloridov a iných činidiel s rôznymi odštiepiteľnými

skupinami. Escrig-Doménech a spol. skúmali reakcie zamerané najmä na zavedenie chromofóru alebo fluorofóru do molekuly analytu, na zavedenie náboja na zvýšenie citlivosti pri detekcii MS alebo na umožnenie separácie pomocou CE. Ich práca popisuje rôzne reakčné činidlá a reakčné schémy určené na zavedenie chromofóru, fluorofóru, ionizovateľnej skupiny alebo trvalého náboja do analytov, ktoré obsahujú alifatický hydroxyl alebo fenolovú skupinu, pričom nemajú iné reaktívne skupiny. Zavedenie náboja je zaujímavé jednak kvôli zvýšeniu citlivosti na MS, pre umožnenie separácie CE, ako aj pre zníženie celkovej prchavosti, čím sa zvýši citlivosť odparovacích detektorov. Derivatizačné činidlá s rovnakou reaktívnou skupinou sa môžu líšiť reaktivitou, ktorá závisí mimo iného od prítomnosti aktivačných skupín a aj od rozšírenia chromogénneho alebo fluorogénneho konjugovaného systému. Zvýšenie reaktivity činidla je však často kompenzované znížením jeho stability a činidlá s vysokou reaktivitou a veľkým konjugátovým systémom sú zvyčajne drahé. Činidlá obsahujúce jeden aromatický kruh sú zvyčajne vhodné na kontrolu priemyselnej kvality. Naopak pre enviromentálne a biochemické aplikácie sa častejšie používajú veľké konjugované systémy, ktoré zaisťujú veľkú molárnu absorpciu alebo vysoký fluorescenčný kvantový výťažok. Je však známe, že kondenzované kruhové systémy majú tendenciu byť karcinogénne. Okrem toho, činidlá s veľkými hydrofóbnymi časťami môžu byť nekompatibilné s bežnými hydro-organickými mobilnými fázami, ak sú príliš hydrofóbne. Z tohto dôvodu sú veľké konjugované systémy často doplnené polárnymi skupinami strategicky umiestnenými v blízkosti reakčnej časti molekuly.

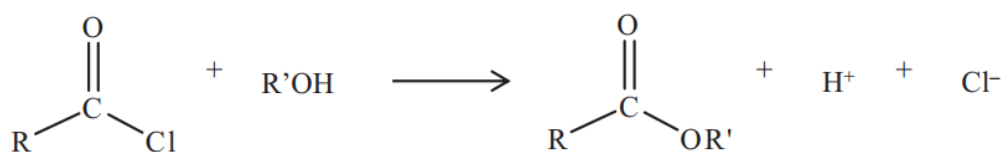
Z jednotlivých typov derivatizačných činidiel spomeňme najprv anhydridy. Medzi tými majú výhodu symetrické cyklické aromatické štruktúry výhodu. Vedú k vzniku jediného derivátu analytu, poskytujúc tak chromofór, ako aj ionizovateľnú karboxylátovú skupinu. Užitočné môžu byť tiež asymetrické činidlá ako SBA (anhydrid 2-sulfobenzoovej kyseliny), anhydrid kyseliny izatoovej a necyklické symetrické anhydridy, ako tie, ktoré sa používajú na zvýšenie prchavosti pre detekciu v MS alebo separáciu pomocou GC.

Viacerí autori potom porovnávali acylchloridy a izokyanáty. Niektoré štúdie tiež porovnávali rôzne organické anhydridy ako činidlá na derivatizáciu ethoxylátov mastných alkoholov, ako aj niekoľko ďalších činidiel na derivatizáciu iných analytov. Pokiaľ ide o stabilitu derivátov, estery sa pomaly hydrolyzujú vo vodnom a hydroorganickom roztoku. Preto by mali byť deriváty vytvorené reakciou s acylchloridmi a organickými hydridmi okamžite analyzované alebo uchovávané v mrazničke. Inak môže dôjsť k ovplyvneniu

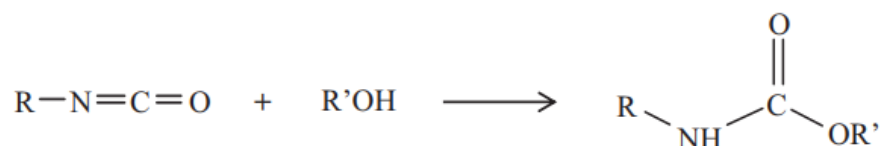
výsledkov, pretože hydrolýza prebieha v rôznymi rýchlosťami u analytov, ktoré majú rôzne alkoholové zvyšky (napr. estery neetoxylovaných alkoholov sa hydrolyzujú oveľa pomalšie ako estery etoxylovaných oligomérov s rovnakým alkylovým reťazcom).

Pokiaľ ide o oblasti použitia, derivatizácia hydroxylových funkčných skupín sa používa hlavne v priemyselnej kontrole kvality a hodnotení vplyvu neionogénnych alifatických povrchovo aktívnych látok na životné prostredie. V niekoľkých prípadoch sa tiež použila na stanovenie aniónových povrchovo aktívnych látok, ktoré sú esterami anorganických kyselín ako kyselina sírová alebo kyselina fosforečná. Ďalšie zaujímavé analyty v priemyselnej a environmentálnej oblasti, ktoré boli tiež derivatizované tými istými spôsobmi, zahŕňajú rozpustné polyméry (ako PEG - polyetylén glykol) a malé polárne molekuly (ako glykoly a iné). Z analytov s pozoruhodnou biologickou aktivitou boli derivatizované napr. fytosteroly, hormóny, di- a monoglyceridy a mnohé ďalšie. Tieto obsahujú jednoduché molekuly ako cholín alebo veľmi zložité molekuly ako endokortikoidy. Matrice zahŕňajú všetky typy bunkových kultúr, biologické tekutiny, tkanivá, jedlo a ďalšie. Rôzne reakčné činidlá a postupy prípravy vzoriek používané v biochemických a súvisiacich oblastiach môžu byť zaujímavé aj v iných oblastiach, ktoré vyžadujú vysokú citlivosť, ako je obvyklý prípad pri štúdiách životného prostredia a naopak [39].

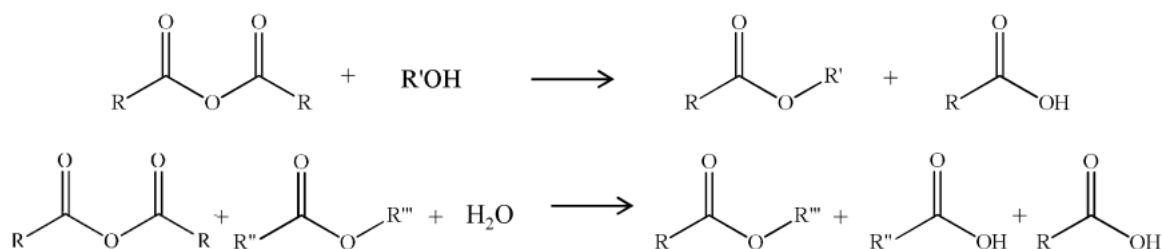
a)



b)



c)

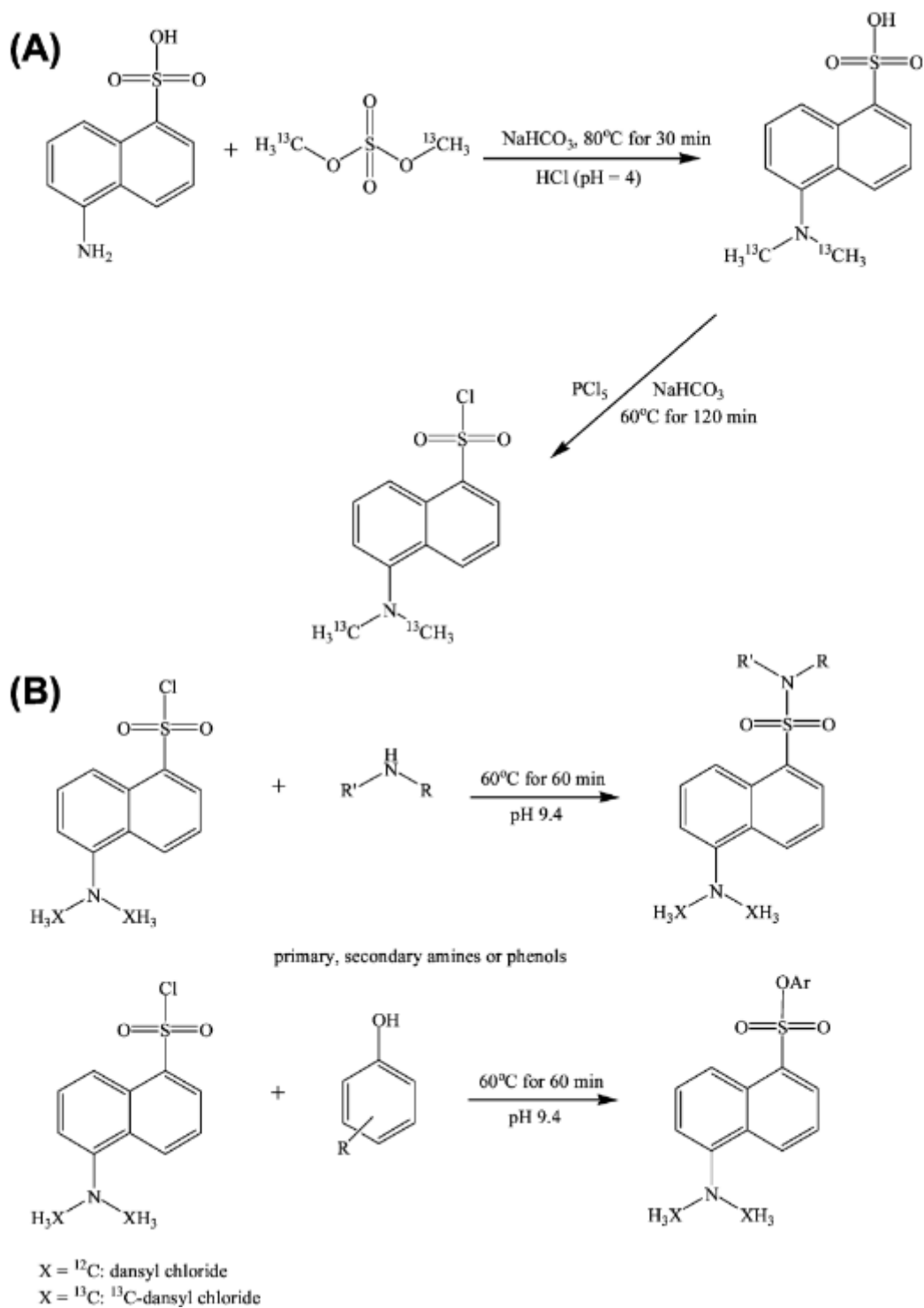


Obr. 6: Derivatizačné reakcie hydroxylových funkčných skupín s acylchloridmi (a), organickými anhydridmi (b) a izokyanátmi (c) [39]

2.4.2 Dansylácia

V práci Guo a spol. bola použitá chemická derivatizácia založená na dansylačnej reakcii pre absolútnu a relatívnu kvantifikáciu aminových a fenolových metabolitov v komplexnej vzorke. Kvantitatívna analýza metabolitov obsahujúcich aminové alebo fenolové funkčné skupiny zahŕňa použitie diferenciálneho izotopového značenia amino a fenolových metabolitov dansylačnou reakciou s $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dansyl chloridom. Syntéza ^{13}C dansyl chloridu ako derivatizačného činidla bola založená na dvojstupňovom postupe, ktorý je zobrazený na Obr. 7 (A). Obr. 7 (B) znázorňuje reakčnú schému pre dansyláciu zlúčenín obsahujúcich amin a fenol. Výhodou použitia dansyl chloridu je, že táto reakcia je jednoduchá, rýchla a široko použiteľná pre radu aminov a fenolov a nevytvárajú sa pri nej takmer žiadne vedľajšie produkty. Ďalšou výhodou je, že dansylované metabolity môžu byť efektívne ionizované a detegované pomocou ESI MS. Pri analýze 20 aminokyselín bolo zvýšenie

signálu pomocou dansylácie o 1-3 rády vyššie v závislosti od typu podmienok a rozpúšťadla použitého pri ESI MS [40].



Obr. 7: Reakčné schémy (A) syntézy izotopového značeného činidla dansyl chloridu ${}^{13}\text{C}_2$ a (B) dansylácia [40]

2.4.3 Methylácia

Methylácia sa používa napr. k zlepšeniu účinnosti ionizácie v MS detekcii. V práci Mok a spol. bola použitá derivatizácia trimethylsilyldiazometánom (TMSD) na zlepšenie účinnosti ionizácie pri profilovaní FFA (voľné mastné kyseliny). Ako FFA boli použité kyselina palmitová, olejová a arachidónová. Na selektívnu kvantifikáciu metylovaných FFA bola použitá metóda MRM. Optimálna methylácia pomocou TMSD bola validovaná na profilovanie FFA. Následne bola vykonaná rýchla vysokoúčinná analýza FFA po krátkej derivatizácii. Na overenie užitočnosti a účinnosti vyvinutej metódy boli porovnávané dáta metylovaných a nemetylovaných FFA pri profilovaní FFA z pečene a plazmy myši. Neupravená kyselina olejová vykazovala 25 krát vyšší LOD ako jej odpovedajúci metylovaný štandard. Citlivosť bola významne zvýšená v prípade štandardov kyseliny palmitovej a kyseliny olejovej. Aj keď neupravená kyselina arachidónová vykazovala rovnaký LOD a citlivosť podobnú jej metylovanej forme, jej priemerná plocha píku bola menšia ako metylovaná forma. LOD pre FFA sú zobrazené v Tab. IV. Methylácia bola výhodná pre získanie lepších výsledkov pri profilovaní FFA [41].

Tab. IV: Validačné dáta a LOD pre FFA [41]

Table 4 Data of validation of methylated fatty acids and LODs

Species	RT ^a (min)	Intraday variation ^b		Interday variation ^c		LOD (ng)	
		RT	Peak area	RT	Peak area	Intact	Methylated
Palmitic acid	1.59	1.6	5.6	1.1	15.1	1600	800
Oleic acid	2.8	0.2	5	0.4	7.1	1000	40
Arachidonic acid	2.15	0.4	4.6	0.4	4.8	100	100
(d8) arachidonic acid-IS	2.09	0.9	1.7	0.6	15	100	100

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité chemikálie a prístroje

Redestilovaná voda (deionizačná stanica Milipore, Molsheim, Francúzsko), acetonitril (HPLC, VWR International, USA), kyselina mravčia (gradient grade, Sigma-Aldrich, USA), bezvodý dimethyl sulfoxid (GC, Sigma-Aldrich, USA), dimethyl sulfoxid (GC, Sigma-Aldrich, USA), dansyl chlorid (HPLC, Sigma-Aldrich, USA), (4-(2-pyridiloxo)phenyl) sulfonyl chlorid hydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA), oktadecyl jodid (Sigma-Aldrich, USA), methyl jodid (Sigma-Aldrich, USA), hydrogénuhličitan sodný (p.a., Penta, Česká Republika), hydroxid sodný (p.a., Penta, Česká republika), methanol (HPLC grade, VWR, Francúzsko), heptán (p.a., Penta, Česká republika), hexán (HPLC, Lach-Ner, Česká republika), chloroform (p.a., Penta, Česká republika), acetón (Fisher Scientific, UK), ethanol (HPLC, Lachner, Česká republika), alfa-amanitín (Sigma Aldrich, USA), beta-amanitín (Sigma Aldrich, USA), tetrahydrofuran (HPLC, Sigma Aldrich, USA), dichlormethan (p.a., Penta, Česká Republika), toluén (GC, Sigma Aldrich, USA).

Ultra-účinný kvapalinový chromatograf Acquity UPLC I-Class (Waters, Milford, USA) s hmotnostným spektrometrom Xevo TQD (Waters) s ionizáciou elektrosprejom a trojitým kvadrupólom. Ultra-účinný kvapalinový chromatograf Acquity UPLC H-Class (Waters) s tandemovým hmotnostným spektrometrom Q-TOF Premier (Waters) s ionizáciou elektrosprejom a hybridným analyzátorom typu kvadrupól - kolízna cela - detektor doby letu.

Chromatografická kolóna Acclaim™ RSLC 120 C18; 2,2 μm , 120 Å; 2,1 \times 100 mm; Dionex Bonded Silica Products (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.2 Parametre merania

Amanitíny boli analyzované pomocou kvapalinového chromatografu s hmotnostným spektrometrom. Meranie bolo prevedené v kladnom ionizačnom móde. Pre MRM meranie boli nastavené parametre, ktoré sú uvedené v Tab. V, Tab. VI a Tab. VII. Pre MS/MS analýzu boli nastavené parametre uvedené v Tab. VIII.

Tab. V: Parametre merania pre MRM DanAb

Parameter	Hodnota
Teplota zdroja	150 °C
Desolvatačná teplota	450 °C
Napätie na kapiláre	1,6 – 2,4 kV
Napätie na vstupnom kónuse	20 - 50 V
Prietok desolvatačného plynu	400 l/hr
Kolízna energia	30 - 90 V

Tab. VI: Parametre merania pre MRM MeDanAb

Parameter	Hodnota
Teplota zdroja	150 °C
Desolvatačná teplota	450 °C
Napätie na kapiláre	1,4 – 2,2 kV
Napätie na vstupnom kónuse	30 - 70 V
Prietok desolvatačného plynu	400 l/hr
Kolízna energia	30 - 90 V

Tab. VII: Parametre merania pre MRM OcdDanAb

Parameter	Hodnota
Teplota zdroja	150 °C
Desolvatačná teplota	450 °C
Napätie na kapiláre	1,6 – 3,2 kV
Napätie na vstupnom kónuse	40 - 95 V
Prietok desolvatačného plynu	400 l/hr
Kolízna energia	30 - 90 V

Tab. VIII: Parametre merania MS/MS MeDanAb

Parameter	Hodnota
Teplota zdroja	100 °C
Desolvatačná teplota	400 °C
Napätie na kapiláre	5 kV
Napätie na vstupnom kónuse	40 V
Prietok desolvatačného plynu	300 l/hr
Kolízna energia	30 a 40 eV

Separácia bola prevedená na chromatografickej kolóne Acclaim RSLC 120 C18 s gradientovou elúciou. Mobilná fáza bola zvolená podľa inej diplomovej práce venujúci sa separácii amanitinov [42]. Obsahovala 0,5% kyseliny mravčej vo vode (A) a 100 % acetonitrilu (B). Prietok mobilnej fáze bol 0,6 ml/min a objem nastrieknutej vzorky bol 5 µl. Chromatografická separácia prebiehala 8,5 minúty. Profil gradientu je uvedený v Tab. IX.

Tab. IX: Profil gradientu mobilnej fáze

	Čas (min)	Prietok (ml/min)	Fáza A (%)	Fáza B (%)
1	0	0,6	98	2
2	1	0,6	98	2
3	5,2	0,6	10	90
4	8,2	0,6	10	90
5	8,5	0,6	98	2

3.3 Príprava vzorky

K príprave vzorky bol použitý zásobný roztok beta-amanitínu s koncentráciou 1 mg/ml, ktorý bol následne nariedený metanolom na koncentráciu 0,1 mg/ml. Pre derivatizáciu boli pripravené dve vzorky. Do každej vialky bolo napipetovaných 20 µl roztoku beta-amanitínu (0,1 mg/ml). Po odľúkaní pod prúdom dusíka bol odparok rozpustený v 20 µl acetonitrilu. K roztoku bolo pridaných 100 µl 0,1 M hydrogénuhličitanového pufru s pH 10, ktorý bol pripravený z hydrogénuhličitanu sodného

a upravený s hydroxidom sodným na pH 10. Následne bolo pridaných ešte 100 µl roztoku dansylchloridu (o koncentrácii 1 mg/ml), ktorý bol pripravený rozpustením dansylchloridu v acetonitrile. Derivatizácia prebiehala zahriatím tejto zmesi na 65 °C po dobu 5 minút. Zmes bola po derivatizácii odľúkaná do sucha za súčasného zahrievania pri 100 °C. K jednej vzorke bolo cez septum pridaných 100 µl bezvodého dimethyl sulfoxidu a 10 µl methyl jodidu. Druhá vzorka bola pripravená prídavkom 100 µl roztoku, pripraveného rozpustením 5 mg oktadecyljodidu v 1 ml bezvodého dimethyl sulfoxidu, k zmesi. Následne boli obe vzorky zahrievané po dobu 180 minút. Zo vzoriek bolo odobratých 20 µl a nariedených do 180 µl acetonitrilu a to v čase: 10, 30, 60, 120 a 180 minút.

Pre meranie MRM boli pripravené vzorky DanAb, MeDanAb a OcdDanAb. Do každej vialky bolo napipetovaných 20 µl roztoku beta-amanitínu (0,1 mg/ml). Po odľúkaní pod prúdom dusíka bol odparok rozpustený v 20 µl acetonitrilu. K roztoku bolo pridaných 100 µl 0,1 M hydrogénuhličitanového pufru s pH 10. Následne bolo pridaných ešte 100 µl roztoku dansylchloridu (1 mg/ml). Derivatizácia prebiehala zahriatím tejto zmesi na 65 °C po dobu 5 minút. Zmes bola po derivatizácii odľúkaná do sucha za súčasného zahrievania pri 100 °C. K vzorke DanAb bolo cez septum pridaných len 100 µl bezvodého dimethyl sulfoxidu. K vzorke MeDanAb bolo cez septum pridaných len 100 µl bezvodého dimethyl sulfoxidu a 10 µl methyl jodidu. K vzorke AcdDanAb bolo pridaných 100 µl roztoku, oktadecyljodidu v dimethyl sulfoxide (5mg/ml). Vzorka DanAb a MeDanAb boli zahrievané po dobu 10 minút. Vzorka OcdDanAb bola zahrievaná 180 minút.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hlavným cieľom práce bolo derivatizovať alfa a beta-amanitin dansyláciou a následným navazaním metylovej príp. oktadecylovej skupiny pre zlepšenie ionizácie týchto látok v MS. Boli preskúvané rôzne prístupy. Pripravené reakčné zmesi boli analyzované metódou UHPLC-MS/MS. Bola použitá gradientová elúcia, kedy sa vychádzalo z podmienok skoršej práce venovanej separácii amanitínov [42] avšak celkové trvanie jednej analýzy bolo predĺžené na 8,5 minúty (viď kapitola 3.2).

4.1 Postupy merania

Prvým krokom bolo potvrdenie reakcie dansyl chloridu s metyljodidom za vzniku metylovaného dansyl chloridu. Neúspešne boli vyskúšané nasledujúce postupy. Najskôr bola pripravená vzorka ktorá obsahovala sulfoyl chlorid rozpustený v ACN (1 mg/ml) a pufr. Po zmeraní nebolo v MS spektre vidno príslušné píky patriace chloridu hydrolyzovanému na sulfonovú kyselinu s hodnotou m/z 270. Pripravená vzorka bola nariadená ACN s 1% HCOOH, pre zlepšenie odozvy analytu v kyslom prostredí. Toto však takisto nepomohlo.

Ďalšie merané vzorky obsahovali 42PPsulfonylCL (1 mg/ml), v jednom prípade doplnená ACN, v druhom potom zmesou voda:ACN - 1:1 – prídavok vody do rozpúšťadla bol uskutočnený s cieľom podporiť hydrolyzu 42PPsulfonylCL na sulfonovú kyselinu. Bola pripravená aj vzorka 42PPsulfonylCL, metyl jodidu a ACN (príp. zmesi ACN:voda - 1:1). Ani v tomto prípade nebolo vidno na MS spektrách príslušné píky s hodnotou m/z 270. Boli pripravené aj vzorky alfa-amanitínu (0,1 mg/ml), 42PPsulfonylCL a ACN. Reakcia taktiež neprebehla podľa očakávania.

Oktadecyl jodid sa v ACN nerozpúšťal úplne. Preto bolo skúšané jeho rozpúšťanie aj v iných rozpúšťadlách a to v acetóne, DMSO a THF. Rozpúšťaním vo viacerých rozpúšťadlách bolo zistené, že oktadecyl jodid sa dobre rozpúšťa v tetrahydrofurane. Preto bol pripravený roztok 61 mg oktadecyl jodidu v 400 µl THF a zmiešaný so 42PPsulfonylCL (1 mg/ml v THF) a THF. Vzorka bola zahrievaná 4 hodiny pri 60 °C a následne 100x nariadená s ACN. Ani tento prístup nevedol k požadovanej reakcii – oktadecylácii aminovej skupiny derivatizačného činidla (pri analýze nebol detegovaný pík o m/z 505). Preto bolo vyskúšané rozpúšťanie oktadecyl jodidu a 42PPsulfonylCL v ďalších rozpúšťadlách: v hexáne, heptáne a chloroforme. 42PPsulfonylCL bol pritom ako druhý

reakčný komponent vždy rozpustený v ethanole (1 mg/ml). Ďalšia vzorka bola pripravená rozpustením oktadecyl jodidu aj 42PPsulfonylCL v toluéne, pretože v tomto rozpúšťadle boli obe zlúčeniny najlepšie rozpustné bez ďalšieho potrebného zahrievania alebo ultrazvukovania. Všetky vzorky boli zahrievané 4 hodiny pri 60 °C a po zahriatí 100x nariadené ethanolom a vzorka pripravená toluénom bola nariadená s ACN. Po zmeraní nebolo vidno žiadne hľadané píky.

Keďže ostatné merania boli prevedené v kyslom protredí, ďalším krokom na zlepšenia merania, ktorý bol použitý, bolo pridanie triethylaminu. Ten vytvára bazické protredie, čo by malo zlepšiť reakciu oktadecyl jodidu so 42PPsulfonylCL. Bola pripravená vzorka oktadecyl jodidu a 42PPsulfonylCL v toluéne a triethylamine. Množstvo použitého triethylaminu bolo ekvimolárne množstvu oktadecyl jodidu. Vzorka bola tiež nariadená v jednom prípade s ACN a v druhom s ethanolom. Meranie nebolo znovu úspešné. Ani zahrievanie 16 hodín pri 60 °C nevedlo k úspešným výsledkom.

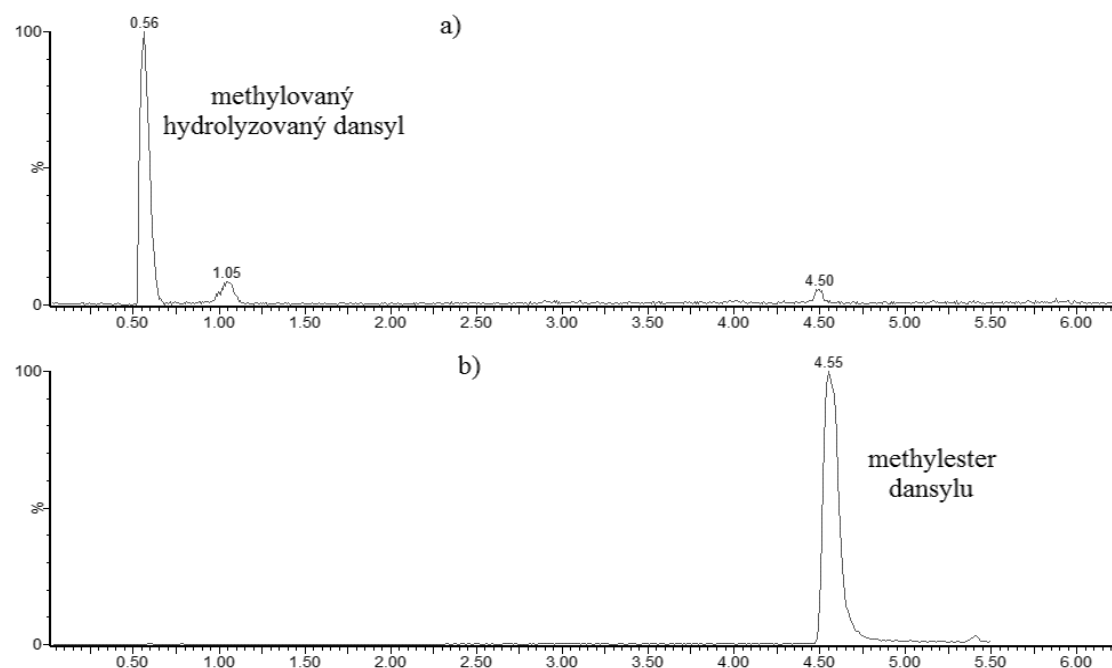
Keďže výsledky s použitým 42PPsulfonylCL neboli úspešné, nedochádzalo ani k vzniku sulfonovej kyseliny, pri ďalších meraniach bol namiesto 42PPsulfonylCL pre prvotnú derivatizáciu použitý dansyl chlorid. Boli pripravené vzorky z dansyl chloridu v ACN (1 mg/ml), pufru a beta-amanitínu (1 mg/ml). Vzorky boli zahriaté a odľukané dosucha. Následne bol k vzorkám pridaný roztok oktadecyl jodidu, ktorý bol rozpustený v rôznych rozpúšťadlách a to v toluéne, ACN, methanole, ethanole a dichlormethane. Vzorky boli opäť zahriaté. Vzorka obsahujúca dichlormethan sa odparila, takže zmeraná nebola. Ostatné vzorky boli nariadené 1:1 s ACN a zmerané. Opäť nebolo vidno príslušné píky v MS spektre.

4.1.1 Meranie s použitím pyridínu

Ďalšie vzorky boli pripravené s použitím pyridínu, ktorý má blízku štruktúru skorej použitých derivatizačných činidiel. Najskôr bolo sledované, či je možné pyridín metylovať. Boli namiešané vzorky methyl jodidu, pyridínu a rozpúšťadla. Ako rozpúšťadla boli použité DMSO, ACN, methanol, acetón, toluén a THF. Po zmiešaní boli vzorky zahrievané, nariadené s ACN a zmerané. Výsledný pík m/z 94 odpovedajúci metylovanému pyridínu bolo vidno vo všetkých prípadoch. Z týchto vzoriek mali najlepší signál vzorky rozpustené v DMSO a methanole. Keďže metylácia pyridínu bola úspešná s použitím DMSO a methanolu, pre ďalšie meranie so 42PPsulfonylCL bol ako rozpúšťadlo použitý methanol,

pretože poskytoval o mierne vyšší signál ako DMSO. 42PPsulfonylCL rozpustený v ethanole (1 mg/ml) bol zmiešaný s pufrom, odľúkaný dosucha a k odparke bol pridaný methanol, voda a methyl jodid. Takto vzniknutá vzorka bola zahriatá pri 50 °C na 15 minút. Po zmeraní vznikala požadovaná sulfonová kyselina. Bolo ju vidno v MS spektre s hodnotou m/z 252.

V závislosti na úspechu predchádzajúceho merania, kedy vznikala sulfonová kyselina, bola pripravená ďalšia vzorka, ktorá obsahovala methyl jodid, 42PPsulfonylCL v ACN (1 mg/ml) a ACN. V jednom prípade bola pripravená následne s alfa-amanitínom s konc. 0,1 mg/ml a v druhom prípade s roztokom alfa-amanitínu s pufrom. Po zmeraní bolo vidno v MS spektre len hodnoty m/z 252, čo je sulfonová kyselina a m/z 266, čo je metylovaná sulfonová kyselina, teda nie príslušné píky alfa-amanitínu. Taktiež boli pripravené vzorky dansyl chloridu s methyl jodidom v methanole a DMSO. Vzorky boli zahrievané 5 minút pri 65 °C a následne zmerané. Chromatogram merania je na Obr. 8 ukazuje píky s rovnakou hodnotou m/z 266, ktoré sa však líšili hodnotami retenčných časov. Vzhľadom na podmienky reakcie a chemické chovanie zlúčenín v zmesi, došlo zrejme k a) metylácii hydrolyzovaného dansylu, ktorého pík eluuje v retenčnom čase 0,56 min a ďalej k b) methoxylácii sulfonyl chloridovej funkčnej skupiny, kde vzniká methylester, ktorého retenčný čas je 4,55 min.



Obr. 8: Chromatogramy zobrazujúce píky s rovnakým m/z 266, a) v prípade metylovaného hydrolyzovaného dansylu a b) v prípade methylesteru dansylu

Vzhľadom k tomu, že reakcie nevedli k požadovaným výsledkom (alkylácia amanitínov derivatizovaných pomocou 42PPsulfonylCL), boli ďalej vzorky pripravované s použitím dansyl chloridu. Avšak bolo aspoň zistené, že je nutné vyhnúť sa použitiu nižších alkoholov ako rozpúšťadiel, pretože reagujú so sulfonyl chloridovou funkčnou skupinou, čo je pre nás nežiadúce. Pre ďalšie merania bol preto použitý bezvodý DMSO, ktorý poskytoval v prípade merania s pyridínom taktiež výborné výsledky.

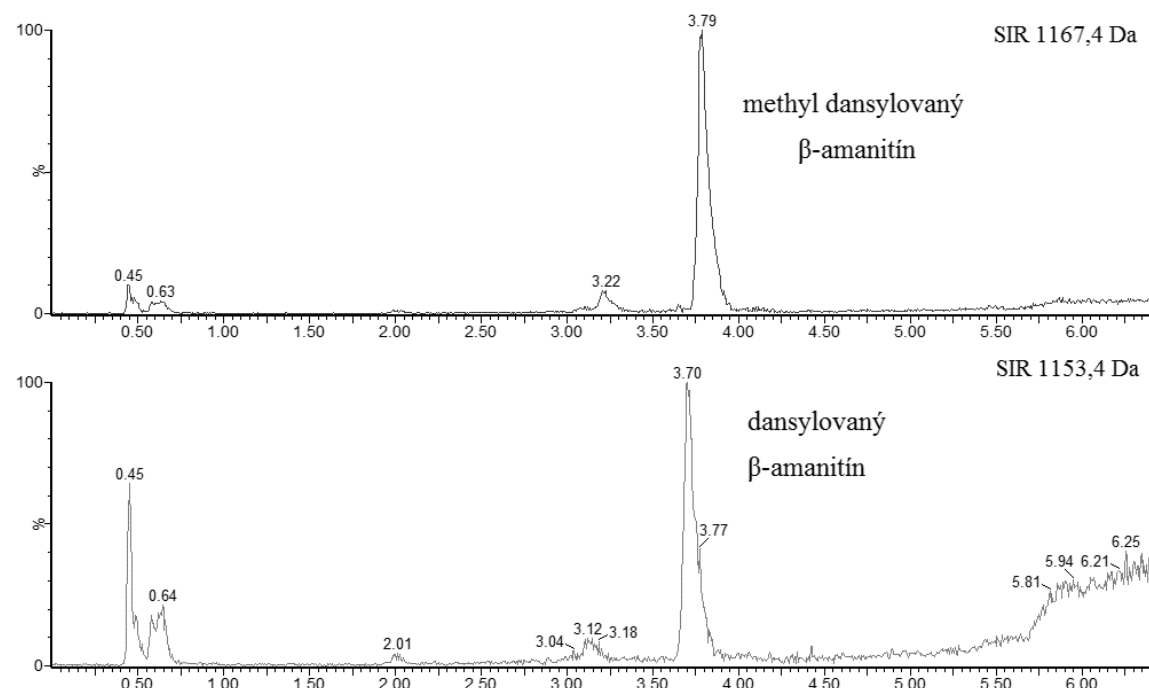
4.2 Optimálny postup pre prípravu alkyl-dansyl-beta amanitín

Keďže alfa-amanitín (dochádzalo k jeho oxidácii) nereagoval ako beta-amanitín, bol pri meraniach použitý len beta-amanitín. Finálny postup prípravy alkylovaných derivátov dansyl-beta-amanitínu vychádza zo skorej uvedených poznatkov ohľadom reaktivity jednotlivých reakčných komponentov. Syntéza bola úspešná s použitím methyl jodidu a taktiež s použitím oktadecyljodidu. Vzhľadom k tomu, že alkyl halogenidy sú náchylné k hydrolyze, bolo nutné vzorky uchovávať vo vysušených vialkách utesnených septom a všetky odbery vzoriek ako aj pridaných chemikálii prevádzať pomocou ihiel a hamiltoniek, aby do vzoriek nebola zanesená voda alebo prípadná vlhkosť. Dôležité je tiež, že sme previedli zmenu oproti predchádzajúcej práci a začali sme pridávať dansyl do pufrovaného amanitínu (analytu) namiesto zmiešania pufru s dansylom, čo by malo vzhľadom k riziku hydrolyzy dansyl chloridu byť bezpečnejšie. Vzorky beta-amanitínu v methanole (zásobný roztok) boli najprv odľukané do sucha, aby následným zmiešaním s dansyl chloridom nevznikal methyl ester sulfonovej kyseliny. Až následne boli rozpustené v malom množstve ACN, potom v pufri a až potom bol pridaný roztok dansyl chloridu, aby nedochádzalo k nežiadúcej reakcii. Následne bol pridaný bezvodý DMSO a methyl jodid (popríklad oktadecyljodid)

4.2.1 Chromatografická analýza reakčnej zmesi metylovaného derivátu s použitím methyl jodidu

Všetky vzorky boli analyzované metódou UHPLC-MS/MS. Vzorky pripravené vyššie uvedeným postupom boli zahrievané na 65 °C a odoberané po 10, 30, 60, 120 a 180 minútach pre sledovanie priebehu alkylácie. Príslušné píky - dansylovaný beta-amanitín

(DanAb) a metylovaný dansylovaný beta-amanitín (MeDanAb) - boli detegované už po 10 minútach ako ukazuje Obr. 9. Na tom sú znázornené SIR chromatogramy pripravenej vzorky beta-amanitínu po derivatizácii a naviazaní methyl jodidu. DanAb (m/z 1153,4) mal retenčný čas 3,70 minút. MeDanAb (m/z 1167,4) mal retenčný čas 3,79 minút.



Obr. 9: SIR chromatogram MeDanAb a DanAb po 10 minútovom zahrievaní

Priemerný retenčný čas chromatogramov 5x opakovaného merania vzorky s methyl jodidom a vzorky pripravenej rovnakým spôsobom ale bez methyl jodidu je uvedený v Tab. X.

Tab. X: Priemerné retenčné časy MeDanAb, DanAb

	MeDanAb	DanAb
Priemerný retenčný čas (min)	$3,78 \pm 0,006$	$3,70 \pm 0,006$

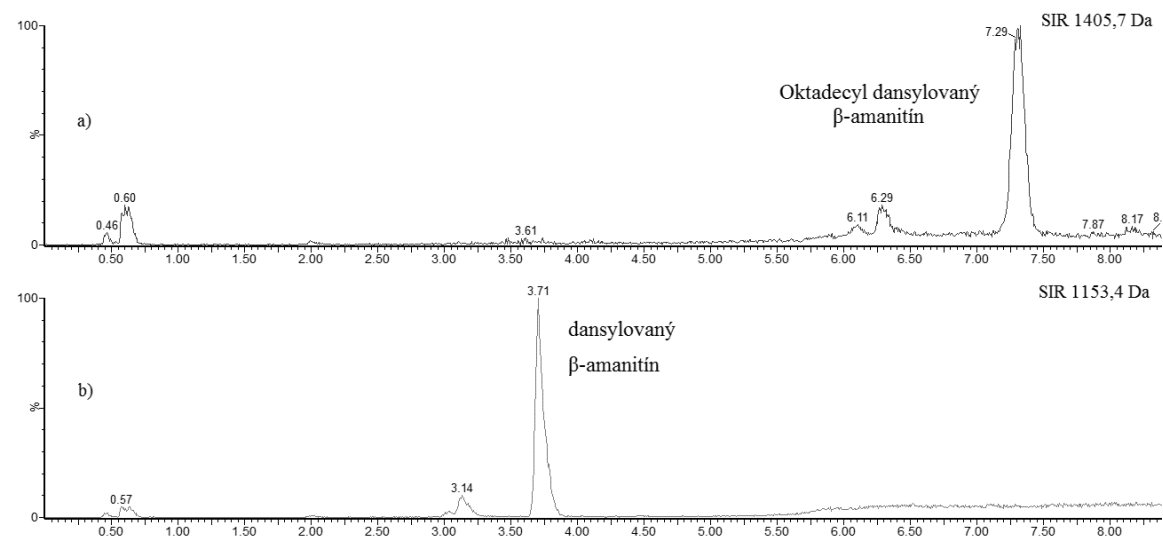
Plocha píkov u jednotlivých vzoriek sa s postupným časom zahrievania líšila. Po 10 minútach zahrievania bola plocha píku požadovaného produktu u oboch, DanAb a MeDanAb, najväčšia. Plochy píkov klesali s rastúcim časom zahrievania. Najväčší pomer plochy píku MeDanAb:DanAb bol pri vzorke, ktorá bola zahrievaná 180 minút. Pri tejto vzorke vidno, že zahrievaním zaniká takmer všetok DanAb a množstvo MeDanAb kleslo takmer o polovicu množstva, oproti 10 minútam, čo je zobrazené v Tab. XI.

Tab. XI: V tabuľke sú zobrazené hodnoty plochy píkov dansylovaného, methyl dansylovaného beta-amanitínu a pomer ich plôch.

Čas (min)	1: Plocha píku dansylovaného β -amanitínu	2: Plocha píku methyl. dansylovaného β -amanitínu	Pomer plochy píku 2:1
10	3726	13234	3,55
30	1645	13215	8,03
60	1105	8276	7,49
120	1077	8782	8,15
180	329	8424	25,60

4.2.2 Chromatografická analýza reakčnej zmesi oktadecylovaného derivátu

Chromatografické podmienky aj podmienky odberu vzoriek boli totožné s predchádzajúcim prípadom. Príslušný pík DanAb (dansylovaný beta-amanitín) a OcdDanAb (oktadecylovaný dansylovaný beta-amanitín) boli detegované už po zahrievaní na 10 minút ako vidno aj na Obr. 10. Sú na ňom znázornené SIR chromatogramy pripravenej vzorky beta-amanitínu a to po derivatizácii a naviazaní oktadecyl jodidu. DanAb (m/z 1153,4) mal retenčný čas 3,71 minút. OcdDanAb (m/z 1405,7) mal retenčný čas 7,29 minút.



Obr. 10: SIR chromatogram po 10 minútovom zahrievaní vzorky a) OcdDanAb odpovedal m/z 1405,7 a b) DanAb odpovedal m/z 1153,4

Priemerný retenčný čas z chromatogramov merania vzorky s oktadecyl jodidom a vzorky pripravenej rovnakým spôsobom ale bez oktadecyl jodidu je uvedený v Tab. XII.

Tab. XII.: Priemerné retenčné časy OcdDanAb, DanAb

	OcdDanAb	DanAb
Priemerný retenčný čas (min)	7,33 ± 0,007	3,70 ± 0,006

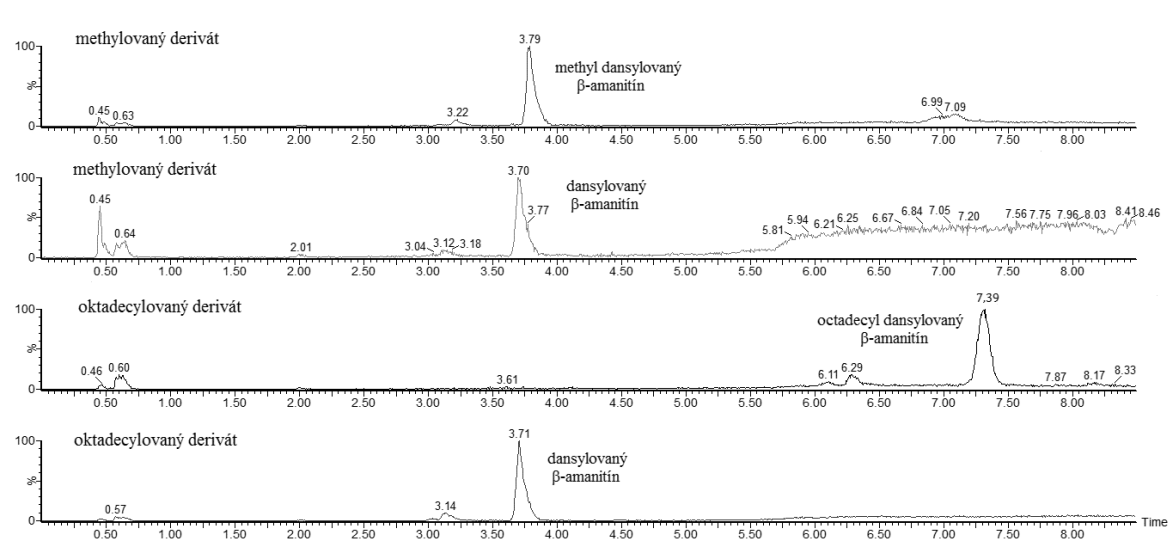
Plocha píkov u jednotlivých vzoriek sa s postupným časom zahrievania líšila. U oktadecylovaného derivátu plochy píkov neklesali s rastúcim časom ako to bolo v prípade metylovaného. Plochy píku u vzorky DanAb klesali s časom zahriatia, avšak plochy píku OcdDanAb s časom naopak rástli. Najväčšia plocha píku tak bola detegovaná u vzorky, ktorá bola zahrievaná najdlhšie, teda 180 minút. Zdá sa teda, že s dlhším časom zahriatia vzniká väčšie množstvo OcdDanAb, z čoho vyplýva aj postupné zväčšovanie pomeru medzi plochami píkov OcdDanAb a DanAb, čo je zobrazené v Tab. XIII.

Tab. XIII: V tabuľke sú zobrazené hodnoty plochy píkovej dansylovaného, oktadecyl dansylovaného beta-amanitínu a pomer ich plôch

Čas (min)	1. Plocha píku dansylovaného β -amanitínu	2. Plocha píku oktadecyl dansylovaného β -amanitínu	Pomer plochy píku 2.:1.
10	24381	9276	0,38
30	18820	14321	0,76
60	17832	18954	1,06
120	16740	25680	1,53
180	445	22303	50,12

4.2.3 Porovnanie metylovanej a oktadecylovanej vzorky

Na Obr. 11 je znázornené porovnanie chromatogramov oboch zmesí po zahrievaní 10 minút. U oboch chromatogramov môžeme vidieť prítomnosť DanAb v rovnakom retenčnom čase (3,70 min). MeDanAb eluuje mierne neskoršie ako DanAb, a to v retenčnom čase 3,79 min a OcdDanAb eluuje ako posledný v retenčnom čase 7,39 minúty. Neskoršia elúcia OcdDanAb oproti MetDanAb je pravdepodobne spôsobená rozdielmi v polarite obidvoch látok – dlhý alkylový reťazec oktadecylu spôsobuje väčšie zadržiavanie tejto zlúčeniny na nepolárnej stacionárnej fáze. Priebeh obidvoch reakcií sa taktiež líši – zatiaľ čo u metylovaného derivátu postačuje na priebeh reakcie kratší reakčný čas (10 min), u oktadecylovaného derivátu je výhodnejšie ponechať reakciu prebiehať po dlhší čas.



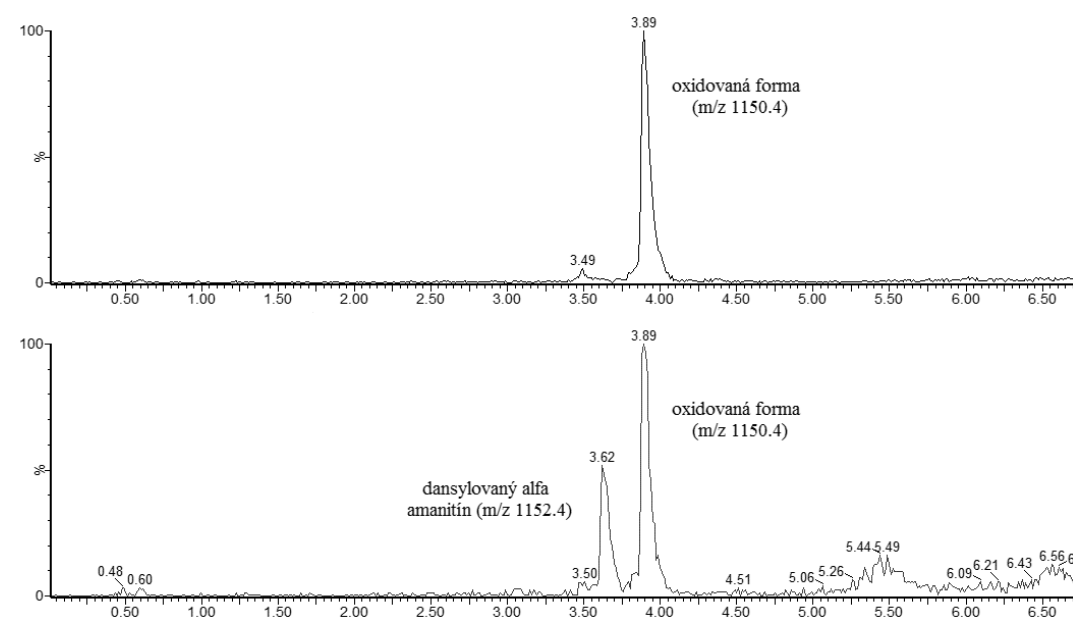
Obr. 11: SIR chromatogram MeDanAb a DanAb + OcdDanAb a DanAb po 10 minútovom zahrievaní

4.3 Príprava vzoriek alfa a beta-amanitínu pre MS, MS/MS, MRM a SIR meranie

Následne bola pripravená sada čerstvých vzoriek alfa a beta-amanitínu. Boli pripravené vzorky: alfa-amanitín s pufrom bez dansyl chloridu a methyl jodidu či oktadecyljodidu, čo slúžilo ako blank, na zistenie toho, čo sa deje so samotným analytom; alfa-amanitín s pufrom a dansyl chloridom bez methyl jodidu alebo oktadecyl jodidu; alfa-amanitín s pufrom, dansyl chloridom a methyl jodidom a alfa-amanitín s pufrom, dansyl chloridom a oktadecyl jodidom. Prvé dve vzorky boli zahrievané 10 a 180 minút. Vzorka s methyl jodidom bola zahrievaná 10 minút keďže v predchádzajúcom meraní, kde sa študovala stabilita amanitínu v rozmedzí 10-180 minút, bol tento čas najlepší. Vzorka s oktadecyl jodidom bola zahrievaná 180 minút, pretože naopak tento čas bol najvýhodnejší v predchádzajúcom meraní pre vzorku obsahujúcu oktadecyl jodid. Takým istým spôsobom boli pripravené aj vzorky beta-amanitínu. Následne bol obsah všetkých vzoriek meraný s využitím MS a MSMS (na prístroji typu QqTOF) a SIR a MRM (na prístroji typu QqQ).

4.3.1 Alfa-amanitín

Vzorka DanAa po zmeraní reagovala inak ako vzorka DanAb. Pravdepodobne u tejto vzorky dochádza k oxidácii amidickej skupiny, keďže u beta-amanitínu k takejto reakcii nedochádza, táto skupina je jediná, v ktorej sa tieto dve látky líšia. Možnou príčinou prečo k tomuto deju dochádza je, že táto látka nevydrží zahrievanie prevádzajúce derivatizáciu. Na Obr. 12 možno vidieť, že oxidovaná forma tejto vzorky má vyššiu intenzitu ako DanAa.

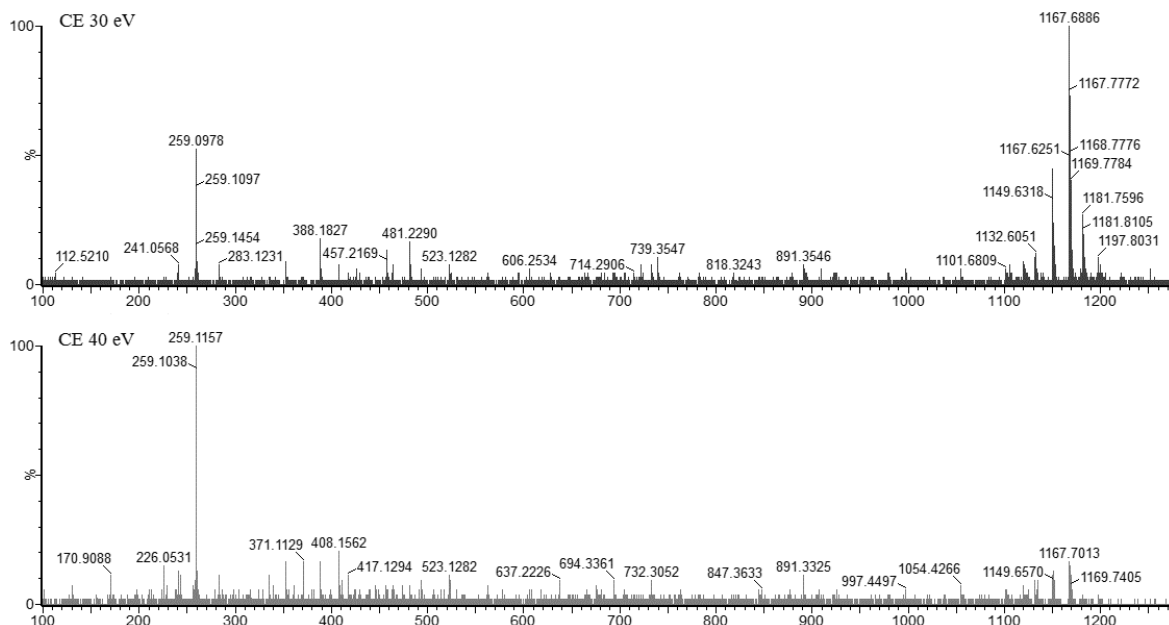


Obr. 12: Namerané chromatogramy vzorky MeDanAa

4.3.2 Analýza vzorky beta-amanitínu

Vzhľadom na to, že vzorka beta-amanitínu poskytla požadovaný produkt, bol tento produkt ďalej analyzovaný v režime MS/MS. Fragmentačné spektrum získané pri kolíznej energii 30 a 40 V je zobrazené na Obr. 13. V tomto spektre je možno vidieť fragmentáciu piku MeDanAb (o m/z 1167,4). Štruktúry fragmentovaných iónov neboli identifikované, hoci zámerom merania bolo zistiť, ktorý fragmentovaný ión sa vyskytuje s najväčšou intenzitou a bol by teda použiteľný pre meranie MRM prechodu. Po zvýšení kolíznej energie z 30 eV na 40 eV je vidno, že pík s m/z 259 vzrástol. Metóda bola teda presunutá na hmotnostný spektrometer typu trojitého kvadrupólu a boli hľadané optimálne podmienky pre MRM prechod 1167,4 → 259,4. Tieto prechody boli hľadané pomocou zmeny

niekoľkých kľúčových parametrov a to kolíznej energie (CE) v rozsahu 30 – 90 V, napätia kapiláry (CV) v rozsahu 1,4 – 3,2 kV a napätie kónusu v rozsahu 20 – 95 V, pre rôzne vzorky inak.



Obr. 13: MSMS spektrum píku m/z 1167,4 zo vzorky MeDanAb pri kolíznych energiách 30, resp. 40 eV.

4.3.2.1 Analýza vzorky metylovaného dansyl-beta-amanitínu s využitím MRM prechodov

Cieľom práce má byť nájdenie lepšej metódy pre detekciu a stanovenie amanitínov. Jednou z najcitlivejších analytických metód pre tento účel je tandemová hmotnostná spektrometria v móde MRM. Pri tejto metóde je izolovaný ión žiadaného analytu, ktorý je následne fragmentovaný a detegovaný je iba jeho charakteristický fragment. Táto metóda je veľmi špecifická (pri zvolení vhodnej kombinácie rodičovského a fragmentovaného iónu) a taktiež citlivá (prístroj je po celý čas analýzy nastavený len na prepúšťanie týchto dvoch iónov). V rámci nájdenia optimálnych meracích podmienok bola vzorka meraná s nastavením MRM prechodu 1167,4 → 259,4 a hodnotami CE v rozmedzí 30 - 90 V. Plochy píkov jednotlivých meraní sú zobrazené v Tab. XIV. Najlepšia hodnota kolíznej energie (v zmysle najväčšej plochy píku) bola 60 V (vyznačená v tabuľke).

Tab. XIV: Plochy píkov merania MRM pri rôznych kolíznych energiách

CE (V)	Plocha píku
30	417
40	2678
50	4999
60	7991
70	5653
80	3236
90	1643

Následne bolo s využitím tejto hodnoty hľadané optimum pre CV. To bolo merané v rozmedzí 1,6 – 2,4 kV. Plochy píkov jednotlivých meraní sú zobrazené v Tab. XV. Najlepšia hodnota napätia kapiláry (v zmysle najväčšej plochy píku) bola 1,8 kV (vyznačená v tabuľke). Pri tejto hodnote mal pík najväčšiu plochu, aj keď plochy sa v celom rozsahu skúmaných hodnôt CV veľmi nelíšili.

Tab. XV: Plochy píkov merania MRM pri rôznom napätí kapiláry

CV (kV)	Plocha píku
1,6	659
1,8	668
2,0	626
2,2	631
2,4	603

Ako posledný parameter pre optimalizáciu bolo následne s využitím vyššie optimalizovaných hodnôt merané optimum pre poslednú kľúčovú veličinu - napätie kónusu. Toto napätie bolo merané v rozmedzí 20 – 50 V. Plochy píkov jednotlivých meraní sú zobrazené v Tab. XVI. Najlepšia hodnota napätia kónusu (v zmysle najväčšej plochy píku) bola 50 V, čo je v tabuľke vyznačené.

Tab. XVI: Plochy píkov merania MRM pri rôznom napätí kónusu

Napätie kónusu (V)	Plocha píku
20	681
25	789
30	849
35	979
40	1038
45	1243
50	1316

Ako optimálne podmienky pre MRM merania prechodu 1167,4 → 259,4 vzorky MeDanAb boli teda stanovené nasledujúce hodnoty: Kolízna energia 60 V, napätie na kapiláre 1,8 kV a napätie kónusu 50 V.

4.3.2.2 Analýza vzorky dansylovaného beta-amanitínu s využitím MRM prechodov

Súčasťou práce je aj porovnanie vplyvu alkylácie na odozvu hmotnostného spektrometra. Ak chceme porovnávať vzorky podrobené len dansylácii so vzorkami dansylovanými a aj alkylovanými, je potrebné optimalizovať takisto podmienky pre meranie MRM prechodu dansylovaného beta-amanitínu. Vzorka bola meraná s nastavením MRM prechodu 1153,4 → 259,4 a rôznymi hodnotami kolíznej energie (CE) v rozmedzí 30 – 90 V. Plochy píkov jednotlivých meraní sú zobrazené v Tab. XVII. Najlepšia hodnota kolíznej energie (v zmysle najväčšej plochy píku) bola 60 V (vyznačená v tabuľke).

Tab. XVII: Plochy píkov merania MRM pri rôznych kolíznych energiách

CE (V)	Plocha píku
30	77
40	696
50	1212
60	1927
70	1309
80	764
90	357

Následne bolo s využitím tejto hodnoty hľadané optimum pre CV. To bolo merané v rozmedzí 1,4 – 2,2 kV. Plochy píkov jednotlivých meraní sú zobrazené v Tab. XVIII. Najlepšia hodnota napätia kapiláry (v zmysle najväčšej plochy píku) bola 1,6 kV (vyznačená v tabuľke). Pri tejto hodnote mal pík najväčšiu plochu, aj keď plochy sa v celom rozsahu skúmaných hodnôt CV veľmi nelíšili.

Tab. XVIII: Plochy píkov merania MRM pri rôznom napätí kapilári

CV (kV)	Plocha píku
1,4	2605
1,6	2613
1,8	2562
2,0	2481
2,2	2519

Ako posledný parameter pre optimalizáciu bolo následne s využitím vyššie optimalizovaných hodnôt merané optimum pre poslednú kľúčovú veličinu - napätie kónusu. Toto napätie bolo merané v rozmedzí 30 – 70 V. Plochy píkov jednotlivých meraní sú zobrazené v Tab. XIX. Najlepšia hodnota napätia kónusu bola 65 V, čo je aj vyznačené. Pri tejto hodnote mal pík najväčšiu plochu.

Tab. XIX: Plochy píkov merania MRM pri rôznom napätí kónusu

Napätie kónusu (V)	Plocha píku
30	2384
35	2607
40	2752
45	3144
50	3332
55	3532
60	3736
65	3879
70	3604

Pre optimalizáciu MRM merania prechodu 1153,4 → 259,4 vzorky DanAb boli teda stanovené nasledujúce podmienky: Kolízna energia 60 V, napätie na kapiláre 1,6 kV a napätie kónusu 65 V.

4.3.2.3 Analýza vzorky oktadecylovaného dansyl-beta-amanitínu s využitím MRM prechodov

V rámci nájdenia optimálnych meracích podmienok bola vzorka meraná s nastavením MRM prechodu 1405,7 → 259,4 a hodnotami kolíznej energie (CE) v rozmedzí 30 - 90 V. Plochy píkov jednotlivých meraní sú zobrazené v Tab. XX. Najlepšia hodnota kolíznej energie (v zmysle najväčšej plochy píku) bola 70 V (vyznačená v tabuľke).

Tab. XX: Plochy píkov merania MRM pri rôznych kolíznych energiách

CE (V)	Plocha píku
30	34
40	385
50	1428
60	1878
70	1913
80	1216
90	887

Následne bolo s využitím tejto hodnoty hľadané optimum pre CV. To bolo merané v rozmedzí 2,4 – 3,4 kV. Plochy píkov jednotlivých meraní sú zobrazené v Tab. XXI. Najlepšia hodnota napätia kapiláry (v zmysle najväčšej plochy píku) bola 3,2 kV (vyznačená v tabuľke). Pri tejto hodnote mal pík najväčšiu plochu, aj keď plochy sa v celom rozsahu skúmaných hodnôt CV veľmi nelíšili. Následne bolo s využitím dvoch optimalizovaných hodnôt hľadané optimum pre napätie kónusu.

Tab. XXI: Plochy píkov merania MRM pri rôznom napätí kapilári

CV (kV)	Plocha píku
2,4	1983
2,6	2536
2,8	2070
3,0	2918
3,2	3529
3,4	3509

Ako posledný parameter pre optimalizáciu bolo následne s využitím vyššie optimalizovaných hodnôt merané optimum pre poslednú kľúčovú veličinu - napätie kónusu. Toto napätie bolo merané v rozmedzí 60 – 95 V. Plochy píkov jednotlivých meraní sú

zobrazené v Tab. XIX. Najlepšia hodnota napätia kónusu bola 90 V, čo je aj vyznačené. Pri tejto hodnote mal pík najväčšiu plochu.

Tab. XXII: Plochy pík merania MRM pri rôznom napätí kónusu

Napätie kónusu (V)	Plocha píku
60	5712
65	6118
70	6370
75	6342
80	6844
85	6935
90	7068
95	7142

Pre optimalizáciu MRM merania prechodu $1405.7 \rightarrow 259.4$ vzorky OcdDanAb boli teda stanovené nasledujúce podmienky: Kolízna energia 70 V, napätie na kapiláre 3,2 kV a napätie kónusu 95 V.

4.3.3 Meranie rozdielov odozvy jednotlivých derivátov beta-amanitínu

Záverečnou fázou práce bolo meranie odozvy jednotlivých pripravených derivátov. Z pomerov ich signálov sa dá odhadnúť, či metylovaný (alebo oktadecylovaný) DanAb poskytuje v MRM móde vyšší signál ako čistý DanAb. Vzorky týchto derivátov boli merané za optimálnych podmienok, zistených pre merania jednotlivých prechodov MRM.

4.3.3.1 Merania vzorky MeDanAb

Ako prvé boli porovnané vzorky MeDanAb a DanAb. V Tab. XXIII sú zobrazené priemerné plochy pík nameraných dát. DanAb bol meraný za jeho optimálnych podmienok. Ďalej bol analyzovaný MeDanAb za optimálnych podmienok jednak pre

DanAb a ďalej pre MeDanAb – v obidvoch boli merané MRM prechody pre DanAb aj MeDanAb.

Tab. XXIII: Meranie odozvy vzoriek DanAb a MeDanAb

MRM						
vzorka		dansylovaný	methylovaný			
			podm. dansylovaný		podm. methylovaný	
			dansyl.	methyl.	dansyl.	methyl.
priemer	0,167 mg/ml	2424,6	76,2	1009,2	55,9	780,8
	1,670 mg/ml	33301,7	113,1	12360,1	98,9	9398,3
smerodajná	0,167 mg/ml	3,66%	9,48%	6,61%	13,79%	10,62%
odchýlka	1,670 mg/ml	8,26%	12,02%	10,33%	3,34%	9,80%

4.3.3.2 Meranie vzorky OcdDanAb

Rovnakým spôsobom boli merané nové vzorky OcdDanAb. V Tab XXIV sú zobrazené priemerné plochy píkov z nameraných dát. DanAb bol meraný za jeho optimálnych podmienok. Ďalej bol analyzovaný OcdDanAb za optimálnych podmienok jednak pre DanAb a ďalej pre OcdDanAb – v obidvoch boli merané MRM prechody pre DanAb aj OcdDanAb.

Tab XXIV: Meranie odozvy vzoriek DanAb a OcdDanAb

MRM						
vzorka		dansylovaný	oktadecylovaný			
			podm. dansylovaný		podm. oktadecylovaný	
			dansyl.	oktadecyl.	dansyl.	oktadecyl.
priemer	0,184 mg/ml	3338,9	866,3	458,1	1161,0	2277,0
	1,840 mg/ml	71942,6	11935,3	5383,5	8151,2	11281,8
smerodajná	0,184 mg/ml	46,67%	12,88%	29,96%	90,27%	410,46%
odchýlka	1,840 mg/ml	42,72%	4,01%	7,78%	24,29%	8,06%

4.3.3.3 Stanovenie prírastku signálu

Z dát merania rozdielov odozvy jednotlivých derivátov bol následne stanovený prírastok signálu amanitínu po metylácii/oktadecylácii DanAb oproti samotnému DanAb. Prírastok bol vypočítaný podľa nasledujúcej úvahy: meranie čistého DanAb v jeho roztoku a meranie reakčnej zmesi pre prípravu MeDanAb za rovnakých podmienok (optimálnych pre DanAb) nám umožní odhadnúť mieru konverzie DanAb na MeDanAb v reakčnej zmesi. Pokiaľ je tá istá vzorka následne zmeraná za podmienok optimálnych pre MeDanAb, môžeme na základe odhadu miery konverzie vypočítať signál čistého MeDanAb pri 100% konverzii a ten porovnať s nameraným signálom DanAb. Meranie jednotlivých vzoriek bolo opakované trikrát a boli vypočítané priemerné hodnoty a ich smerodajné odchýlky.

V prípade vzorky MeDanAb bol priemerný prírastok signálu o $30,8 \% \pm 3,5 \%$ väčší, než signál DanAb a u OcdDanAb bol priemerný prírastok signálu o $55,4 \% \pm 51,8 \%$ väčší, než signál DanAb. V prípade vzorky MeDanAb je smerodajná odchýlka ešte prijateľná. Na rozdiel od toho, je smerodajná odchýlka OcdDanAb pomerne vysoká. V prípade vysokej smerodajnej odchýlky by bolo nutné ešte vyladiť podmienky HPLC merania. Výsledok mohol byť ovplyvnený aj vedľajšími reakciami, pri ktorých môžu vznikajú iné produkty, prípadne sa mohli DanAb a alkylované produkty rozkladať. Teoreticky bola alkylácia úspešná, vzhľadom k zavedeniu pevného kladného náboja na štruktúre analytu. Riešením by mohlo byť napr. aj použitie už hotového činidla, ktoré by sa nemuselo syntetizovať v dvoch krokoch, tak ako to bolo vykonané v tejto práci (tzn. dansylácia a následná alkylácia).

5 ZÁVER

Táto diplomová práca bola zameraná na stanovenie amanitínov. Experimentálna časť bola zameraná na úpravu vzoriek s použitím vhodných rozpúšťadiel, postup derivatizácie a nastavenie parametrov merania v systéme UHPLC-MS/MS. Cieľom práce bolo zlepšenie podmienok pre detekciu alfa alebo beta-amanitínu v pripravených vzorkách metódou UHPLC-MS/MS. Súčasťou optimalizácie metódy bola úprava vzoriek derivatizáciou dansyl chloridom a následnou alkyláciou za účelom zvýšenia signálu vzorky pri meraní.

V rámci práce boli nájdené optimálne podmienky pre dvojkrokovú úpravu vzorky obsahujúcu amanitín, v našom prípade beta-amanitín. Dôležitou zmenou bolo pri príprave vzorky pridávanie dansylu do pufrovaného amanitínu namiesto zmiešania pufru s dansylom, čo by malo byť bezpečnejšie, vzhľadom k riziku hydrolyzy dansyl chloridu. Vzhľadom k tomu, že alkyl halogenidy sú náchylné k hydrolyze, bolo nutné vzorky uchovávať vo vysušených vialkách utesnených septom a všetky odbery vzoriek ako aj pridaných chemikálii prevádzať pomocou ihiel a hamiltoniek, aby do vzoriek nebola zanesená voda alebo prípadná vlhkosť.

Po úspešnom detegovaní vzoriek beta-amanitínu a zmeraní MS/MS spektra, ktoré vykazovalo vysoký fragmentačný pík s m/z 259,4 boli navrhnuté optimálne podmienky pre meranie MRM prechodov cieľových derivátov – vo všetkých prípadoch bol ako fragmentový ión vybraný ión s m/z 259,4, ktorý bol ako produkt fragmentácie amanitínov popísaný aj v literatúre. Pri optimálnych podmienkach boli následne opakovane zmerané intenzity MRM prechodov, z ktorých boli stanovené hodnoty prírastku signálu v dôsledku derivatizácie beta-amanitínu. Alkylácia by teoreticky mohla byť úspešná, vzhľadom k zavedeniu pevného kladného náboja na štruktúre analytu. Do budúcnosti by bolo vhodné ďalej upraviť podmienky syntézy derivatizačných činidiel (s cieľom dosiahnuť čo najlepšieho výťažku alkylovaného derivátu) a stanoviť základné parametre metódy – napr. presnosť, správnosť, linearitu, limity detekcie, kvantifikácie apod.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] H. Persson, Mushrooms, *Medicine* 44 (2016) 116–119.
- [2] <http://emedicine.medscape.com/article/167398-overview>, stiahnuté 17. septembra 2017.
- [3] W.S. Jo, M.A Hossain, S.C. Park, Toxicological profiles of poisonous, edible, and medicinal mushrooms, *Mycobiology* 42 (2014) 215–220.
- [4] Ojanperä, I. Mushroom toxins. *Handbook of Analytical Separations* 2 (2000) 351–357.
- [5] P. Škubla, *Tajomné huby, Príroda*, Bratislava 1989.
- [6] <https://www.nahuby.sk/atlas-hub/Amanita-phalloides/muchotravka-zelena/muchomurka-zelena/ID304>, stiahnuté 17. septembra 2017.
- [7] <http://www.ruvzke.sk/sk/muchotravka-zelena>, stiahnuté 17. septembra 2017
- [8] <https://sk.medlicker.com/621-otrava-muchotravkou-zelenou-priciny-priznaky-diagnostika-a-liecba>, stiahnuté 11. februára 2018.
- [9] <http://www.mushroom-appreciation.com/death-cap.html#sthash.XyVxXT0x.crFN9la9.dpbs>, stiahnuté 17. septembra 2017.
- [10] S. Plačková, J. Kresánek, B. Cagáňová, *Intoxikácie hubami, rastlinami a živočíšnymi toxínmi*, Herba, Bratislava 2013.
- [11] V.A. Robinson-fuentes, J.L. Jaime-Sánchez, L. García-Aguilar, M. Gómez-Peralta, M.S. Vázquez-Garcidueñas, G. Vázquez-marrufo, Determination of α - and β -amanitin in clinical urine samples by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47 (2008) 913-917.
- [12] S. Garg, V. Vardhan, S. Sood, Mushroom Poisoning, *Medical Journal Armed Forces India* 59 (2003) 266-268.
- [13] <https://adcreview.com/adc-university/adcs-101/cytotoxic-agents/%CE%B1-amanitin/>, stiahnuté 17. septembra 2017.
- [14] <https://www.revolvy.com/main/index.php?s=Beta-Amanitin>, stiahnuté 17. septembra 2017.
- [15] <http://funite.science/>, stiahnuté 5. apríla 2018.
- [16] B. Puschner, Mushroom toxins, *Veterinary Toxicology*, Elsevier (2012) 1140.
- [17] R.Y. Andres, W. Frei, [125I]amatoxin and anti-amatoxin for radioimmunoassay prepared by a novel approach: chemical and structural considerations, *Toxicon* 25 (1987) 915-22.

- [18] <http://www.antibodies-online.com/resources/17/1215/radioimmunoassay-ria/>, stiahnuté 13. februára 2018.
- [19] A. R. Abuknesha, A. Maragkou, A highly sensitive and specific enzyme immunoassay for detection of α -amanitin in biological fluids, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379 (2004) 5-6.
- [20] R. Butera, C. Locatelli, T. Coccini, L. Manzo, Diagnostic Accuracy of Urinary Amanitin in Suspected Mushroom Poisoning, *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 42 (2004) 901-912.
- [21] R. Dorizzi, D. Michelot, F. Tagliaro, S. Ghielmi, Methods for chromatographic determination of amanitins and related toxins in biological samples, *Journal of Chromatogr.* 580 (1992) 279-291.
- [22] H. H Maurer, Ch. J Schmitt, A. A Weber, T. Kraemer, Validated electrospray liquid chromatographic–mass spectrometric assay for the determination of the mushroom toxins α - and β -amanitin in urine after immunoaffinity extraction, *Journal of Chromatogr.: Biomedical Sciences and Applications* 748 (2000) 125-135.
- [23] O. Brüggemann, M. Meder, R. Freitag, Analysis of amatoxins α -amanitin and β -amanitin in toadstool extracts and body fluids by capillary zone electrophoresis with photodiode array detection, *Journal of Chromatogr.* 744 (1996) 167-176.
- [24] T. Stivje, R. Seeger, *Naturforsch* 34 (1979) 1133.
- [25] J. H. Haines, E. Lichstein, D. Glickerman, A fatal poisoning from an amatoxin containing *Lepiota*, *Mycopathologia* 93 (1986) 15-17.
- [26] M. Beuhler, D. C Lee, R. Gerkin, The Meixner test in the detection of α -amanitin and false-positive reactions caused by psilocin and 5-substituted tryptamines, *Annals of Emergency Medicine* 44 (2004) 114-120.
- [27] https://lcs0.epfl.ch/files/content/sites/lcs0/files/load/TLC_Stains.pdf, stiahnuté 11. februára 2018.
- [28] A. Jaeger , F. Jehl, F. Fleisch, P. Sauder, J. Kopferschmitt, Kinetics of amatoxins in human poisoning: therapeutic implications. *J Toxicol Clin Toxicol* 31 (1993) 63–80.
- [29] F. Enjalbert, C. Gallion, F. Jehl, H. Monteil, H. Faulstich, Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatogr.* 598 (1992) 227-236.
- [30] W. Rieck, D. Platt, High-performance liquid chromatographic method for the determination of α -amanitin and phalloidin in human plasma using the column-switching technique and its application in suspected cases of poisoning by the green species of

amanita mushroom (*Amanita phalloides*), *Journal of Chromatogr.: Biomedical Sciences and Applications* 425 (1988) 121-134.

[31] C. Defendenti, E. Bonacina, M. Mauroni, L. Gelosa, Validation of a high performance liquid chromatographic method for alpha amanitin determination in urine, *Forensic Science International* 92 (1998) 59-68.

[32] J. Garcia, V. M. Costa, P. Baptista, M. Bastos, F. Carvalho, Quantification of alpha-amanitin in biological samples by HPLC using simultaneous UV- diode array and electrochemical detection, *Journal of Chromatogr.* 997 (2015) 85-95.

[33] G. Caccialanza, C. Gandini, R. Ponci, Direct, simultaneous determination of α -amanitin, β -amanitin and phalloidine by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 3 (1985) 179-185.

[34] A. G. Helfer, M. R. Meyer, J. A. Michely, H. H. Maurer, Direct analysis of the mushroom poisons α - and β -amanitin in human urine using a novel on-line turbulent flow chromatography mode coupled to liquid chromatography–high resolution-mass spectrometry/mass spectrometry, *Journal of Chromatogr.* 1325 (2014) 92-98.

[35] M. Leite, A. Freitas, A. M. Azul, J. Barbosa, S. Costa, F. Ramos, Development, optimization and application of an analytical methodology by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determination of amanitins in urine and liver samples, *Analytica Chimica Acta* 799 (2013) 77-87.

[36] W. H. A. Ahmed, K. Gonmori, M. Suzuki, K. Watanabe, O. Suzuki, Simultaneous analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, *Forensic Toxicology* 28 (2010) 69-76.

[37] I. S. Krull, R. Strong, Derivatization, II/ *CHROMATOGRAPHY: LIQUID*, (2000) 583-591.

[38] Y. Z. Baghdady, K. A. Schug, Review of in situ derivatization techniques for enhanced bioanalysis using liquid chromatography with mass spectrometry, *Journal of Separation Science* 39 (2016) 102-114.

[39] A. Escrig-Doménech, E. F. Simó-Alfonso, J. M. Herrero-Martínez, G. Ramis-Ramos, Derivatization of hydroxyl functional groups for liquid chromatography and capillary electroseparation, *Journal of Chromatogr.* 1296 (2013) 140-156.

[40] K. Guo, L. Li, Differential ^{12}C -/ ^{13}C -Isotope Dansylation Labeling and Fast Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Absolute and Relative Quantification of the Metabolome, *Anal. Chem.* 81 (2009), 3919–3932.

[41] Mok Hyuck Jun, Lee Jae Won, Bandu Raju, Hong Seok Kang, Kyun-Hwan Kim, Kwang Pyo Kim, A rapid and sensitive profiling of free fatty acids using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/ MS) after chemical derivatization, RSC Adv. 6 (2016), 32130–32139.

[42] V. Šaparová, Průkaz a stanovení vybraných amatoxinů ve vzorcích s biologickou maticí, diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2015