

**Karol Kula, Sebastian Rojek, Wiesława Klementowicz, Małgorzata Kłys,
Tomasz Konopka**

Analiza alkaloidów cisa pospolitego w materiale biologicznym z zastosowaniem metod chromatograficznych

Analysis of taxus baccata alkaloids in biological samples with the use of chromatographic methods

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej UJ CM
Kierownik: prof. dr hab. n. med. M. Kłys

Celem eksperymentu było opracowanie metody identyfikacji tzw. taksyn (taksyny B oraz izotaksyny B) zawartych w igłach cisa pospolitego i zastosowanie jej do analizy materiałów pochodzenia biologicznego. Przedmiotem badań była analiza taksyn w materiale sekcyjnym pobranym ze zwłok 15-letniej dziewczyny, która spożyła igły cisa w celach samobójczych. Po kilku godzinach jej hospitalizacji nastąpił zgon. Ze względu na brak komercyjnie dostępnego wzorca taksyn, a w szczególności taksyny B i izotaksyny B, opracowano wstępną metodę ich izolacji z materiału roślinnego, a następnie oczyszczania z zastosowaniem metod chromatografii cienkowarstwowej (TLC) i ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Analizę identyfikacyjną taksyny B i izotaksyny B w ekstrakcie z igieł cisa prowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-ESI-MS-MS). Opracowaną metodę zastosowano do analizy materiałów pobranych ze zwłok. Taksyny ekstrahowano z materiału biologicznego w układzie ciecz-ciało stałe i poddano analizie przy użyciu opracowanej metody. Badania identyfikacyjne wszystkich ekstraktów z materiałów pobranych ze zwłok wykazały obecność taksyny B i izotaksyny B. Wynik analizy pozostał w zgodności z obrazem makro- i mikroskopowym.

The aim of the experiment was to develop a method of the identification of taxines (taxine B and isotaxine B) from *Taxus* leaves and its application to the

analysis of biological samples collected from the deceased girl. The object of the investigation was the analysis of taxines in post-mortem samples collected from a 15-year-old girl, who consumed leaves of *Taxus baccata* to commit suicide. She died after several hours of hospitalization. Taxus alkaloids, especially taxine B and isotaxine B, are not commercially available. Due to this fact, the authors worked out a preliminary method of isolating taxines from *Taxus* leaves and their extraction using thin layer chromatography (TLC) and solid-phase extraction (SPE). Identification of the presence of taxine B and isotaxine B in the extract from *Taxus* leaves was performed by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with electrospray ionization (HPLC-ESI-MS-MS). The developed method was applied to determination of taxine B and isotaxine B in the biological samples collected from the girl's body. The samples were prepared using solid-phase extraction (SPE) and analyzed by HPLC-ESI-MS-MS. The results demonstrated that all the samples contained taxine B and isotaxine B. The results of toxicological investigations were confirmed by macroscopic and microscopic histological examinations.

Słowa kluczowe: zatrucie, cis pospolity, taksyna B, chromatografia
Key words: poisoning, *taxus baccata*, taxine B, chromatography

WSTĘP

Cis pospolity (*Taxus baccata* L.) to gatunek wiecznie zielonego, iglastego drzewa lub dużego krzewu z rodziny cisowatych, o ciemnozielonej koronie i żywobrzazowej korze pnia [1]. Jest on drzewem długowiecznym. Obecnie najstarszym polskim drzewem jest cis pospolity rosnący w Henrykowie Lubańskim. Jego wiek ocenia się na ponad 1250 lat [2].

Łacińska nazwa cisa pospolitego (*Taxus baccata*) pochodzi od dwóch słów związanych kolejno z jego zastosowaniem i posiadaniem charakterystycznych, czerwonych nasion. Pierwszym z nich jest *taxus*, oznaczający łuk. Drugie słowo to *baccata*, pochodzące od łacińskiego *bacca*, czyli „mający jagody”.

Cis pospolity jest objęty ścisłą ochroną gatunkową. Jest pierwszą rośliną w Polsce objętą ochroną na mocy Statutu Warckiego wydanego w 1423 roku przez Władysława Jagiełłę [3], który chciał ograniczyć eksport drewna cisowego będącego surowcem do wyrobu bardzo dobrej jakości łuków.

Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 lipca 2004 roku w sprawie gatunków dziko występujących roślin objętych ochroną (Dz.U. Nr 168, poz. 1764) kwalifikuje cisa pospolitego, jako gatunek dziko występujący, objęty ochroną ścisłą, wymagający ochrony czynnej. *Taxus baccata* występuje również w Polskiej Czerwonej Księdze Roślin, obejmującej gatunki zagrożone wyginięciem na terenie Polski, a także te, które już wyginęły. W księdze tej cis należy do kategorii VU, oznaczającej gatunki narażone na wyginięcie.

Substancje zawarte w cisie pospolitym odznaczają się właściwościami leczniczymi, ale również toksycznymi, spowodowanymi obecnością alkaloidów z grupy taksyn, zwłaszcza tzw. taksyny B i izotaksyny B.

Celem pracy było opracowanie metody identyfikacji taksyny B oraz izotaksyny B w próbkach biologicznych pobranych od zmarłej, która w celach samobójczych spożyła igły cisa. Ze względu na brak komercyjnie dostępnego, certyfikowanego wzorca tego związku, opracowano również metodę jego izolacji z materiału roślinnego.

OPIS PRZYPADKU

Piętnastoletnia dziewczyna spożyła w celach samobójczych bliżej nieokreśloną ilość igieł cisa

pospolitego. Zaobserwowano u niej takie objawy, jak: biegunka, bóle brzucha oraz wymioty, zawierające brązową pianę. Utraciła przytomność i stwierdzono u niej brak tętna. Została następnie przetransportowana do szpitala, gdzie podjęto akcję reanimacyjną. Po kilku godzinach hospitalizacji nastąpił zgon.

Sekcja zwłok oraz badania histologiczne wykazały szereg zmian w obrębie narządów wewnętrznych, w tym ostre poszerzenie jam serca, z obfitymi skrzepami, zapalenie przekrwienne w drogach oddechowych i jelitach, przekrwienno-nadżerkowe zapalenie żołądka z krwistą treścią oraz tworami przypominającymi igły drzewa iglastego. Stwierdzono również wybroczyny krwawe podnasierdziowe i podopłucnowe oraz niewielkiego stopnia obrzęk mózgu i przekrwienie opony pajęczej mózgu.

Medyk sądowy określił przyczynę zgonu, jako ostrą niewydolność krążenia, której wykładnikiem morfologicznym w obrazie sekcyjnym był obrzęk płuc oraz ostra rozstrzeń jam serca.

Ostra niewydolność krążenia mogła mieć charakter ośrodkowy. Mogła być spowodowana uszkodzeniem ośrodków krążenia i oddychania w mózgowiu, na przykład na tle ostrego niedokrwienia i niedotlenienia mózgu, przy nagłym zatrzymaniu krążenia. Na ostre niedotlenienie wskazywały wybroczyny podnasierdziowe i podopłucnowe. Zgon mógł nastąpić na tle ostrego zatrucia, dlatego też zarządzono przeprowadzenie badań toksykologicznych materiałów z narządów pobranych ze zwłok.

MATERIAŁ I METODY

Materiał biologiczny

Materiał biologiczny stanowiła:

- krew kontrolna otrzymana z Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa do opracowania i optymalizacji procedury analitycznej oznaczania izomerów taksyny B;
- krew pobrana zażyciowo od zmarłej w szpitalu;
- krew sekcyjna z płuc, serca oraz ociekлина z mózgu pobrane ze zwłok.

Wzorce i odczynniki chemiczne

Metanol czystości cz.d.a. (POCh, Gliwice), woda dejonizowana (Merck, Niemcy). Diazepam-d5 (LGC Standards, Warszawa), jako wzorzec wewnętrzny (IS). Kolumnienki do ekstrakcji do fazy stałej (SPE) LiChrolut RP-18E o masie złoża 500 mg (Merck, Niemcy).

Ekstrakcja

Odważono 8 g wysuszonych, pociętych igieł cisa, dodano 60 ml metanolu. Następnie, wytrząsano przez 2 godziny i pozostawiono na 2 dni. Supernatant zagęszczono do 4 ml, odwirowano, a następnie oczyszczono za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). W tym celu zastosowano układ eluentów, taki jak dichlorometan: metanol (20:1; v:v). Do dalszej analizy wybierano plamkę startową, którą zeszkrobywano, rozpuszczano w metanolu, pobierano supernatant i odparowywano do sucha w strumieniu azotu. Powstałą w ten sposób suchą pozostałość rozpuszczono w 1 ml metanolu, a następnie poddano ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Kolumnienki SPE kondycjonowano za pomocą 1 ml metanolu, 1 ml wody oraz 1 ml buforu węglanowo-amonowego o pH 9,3. Następnie, badaną próbkę rozcieńczono pięciokrotnie buforem węglanowo-amonowym o pH 9,3, dodano diazepam-d5, jako wzorca wewnętrznego w ilości 100 ng/ml próbki i nastrzyknięto na kolumnienki SPE. Poddano je następnie myciu 2 ml buforu węglanowo-amonowego o pH 9,3 i suszono pod próżnią przez 30 minut. Anality eluowano za pomocą 2 ml mieszaniny metanol: 0,5 M CH₃COOH (9:1; v:v). Ekstrakty odparowano do sucha w strumieniu azotu i rozpuszczono w fazie HPLC (0,1 M mrówczan amonu zakwaszony kwasem mrówkowym do pH 3,2). Powstały ekstrakt stanowił wzorec, wykorzystywany do optymalizacji metody detekcji taksyn w materiale biologicznym.

Próbki krwi oraz ociekлина z mózgu zostały poddane ekstrakcji do fazy stałej (SPE) według procedury analogicznej, jak dla ekstraktu z igieł cisa.

METODA IDENTYFIKACJI IZOMERÓW TAKSYNY B

Rozdział chromatograficzny

Zastosowano chromatograf cieczoowy (Agilent 1200, USA), wyposażony w kolumnę Li-ChroCART Superspher[®] 100 RP-18E o długości 125 mm, szerokości 3 mm i wielkości ziarna 5 μm. Faza ruchoma, czyli 0,1 M mrówczan amonu zakwaszony kwasem mrówkowym do pH 3,2 (faza A) oraz acetonitryl (faza B) przepływała przez kolumnę w izokratycznym udziale faz (65% fazy A: 35% fazy B). Natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 0,4 ml/min, a objętość nastrzyku na kolumnę 5 μl.

Detekcja

Zastosowano kwadrupolowy, tandemowy spektrometr mas (Agilent 6410, USA), wyposażony w źródło jonizacji typu elektrosprej. Spektrometr mas pracował w opcji monitorowania wybranych reakcji (MRM). Dla taksyny B i izotaksyny B monitorowano dwa przejścia *m/z* 584,4 → 194,2 przy energii dysocjacji zderzeniowej równej 20 V, oraz 584,4 → 107,1 przy energii dysocjacji zderzeniowej równej 50 V. Dla diazepam-d5 wybrano przejście *m/z* 290,0 → 198,0 przy energii dysocjacji zderzeniowej równej 35 V. Zastosowano napięcie na fragmentorze wynoszące 140 V.

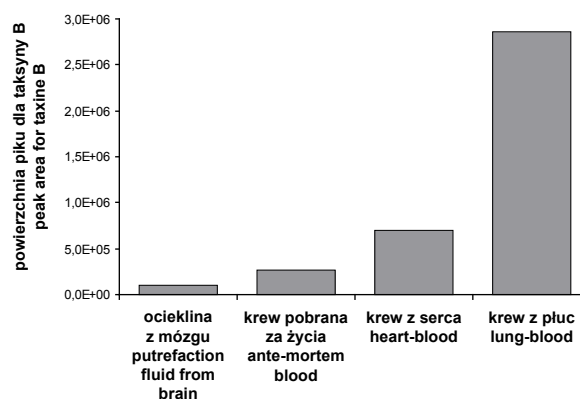
WYNIKI

Wyniki identyfikacji izomerów taksyny B

W wyniku przeprowadzonej analizy ekstraktów z poszczególnych materiałów pobranych za życia i ze zwłok wykazano w nich obecność izomerów taksyny B (ryc. 1). Ze względu na brak wzorca oznaczanych związków, możliwa była jedynie ich identyfikacja. Została ona przeprowadzona na podstawie otrzymanych sygnałów analitycznych, rozumianych jako stosunek pola powierzchni piku dla taksyny B lub izotaksyny B do diazepam-d5. Ocena otrzymanych wyników może sugerować, iż najwyższe stężenie identyfikowanych związków wykazano we krwi z płuc, a najniższe w ocieklinie z mózgu.

Ryc. 1. Wyniki analizy taksyny B dla poszczególnych materiałów biologicznych.

Fig. 1. . Results of the analysis of taxine B for particular biological samples.



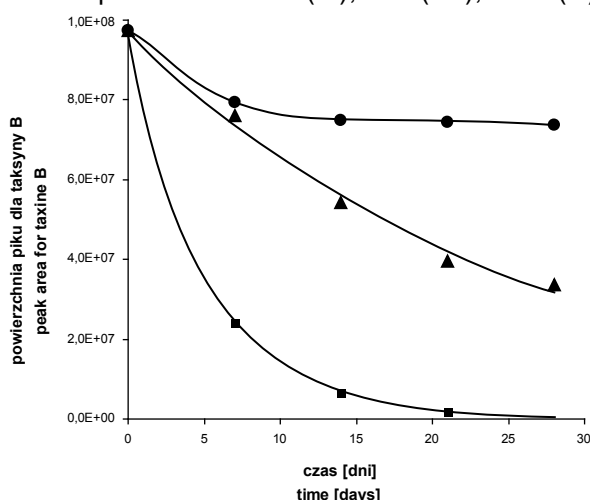
Badanie stabilności taksyny B

Dla próbek krwi z dodatkiem taksyny B, przeprowadzono badanie stabilności (ryc. 2)

w trzech temperaturach przechowywania materiału biologicznego (-20,4 i 25°C). Największy spadek wartości sygnału analitycznego, mierzonego jako stosunek powierzchni pików dla taksyny B i wzorca wewnętrznego, w ciągu 28 dni, wynoszący 99,5%, zaobserwowano dla temperatury 25°C, a najmniejszy (24,4%) dla temperatury -20°C.

Ryc. 2. Stabilność taksyny B w próbkach krwi przechowywanych w trzech temperaturach: -20°C (●), 4°C (▲), 25°C (■).

Fig. 2. Taxin B stability in blood samples stored at three temperatures: -20°C (●), 4°C (▲), 25°C (■).



DYSKUSJA

Cis pospolity znalazł szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach życia. Między innymi był używany jako surowiec do produkcji łuków, kusz, wiosł, naczyń, grzebieni itp. [1]. Niegdyś budowano z jego drewna kościoły, porty oraz tzw. dworki cisowe. Krzaki cisa stanowiły również roślinę ozdobną, często sadzoną w ogrodach i parkach.

Cis pospolity znalazł także zastosowanie jako roślina lecznicza. Odwar z jego igieł był stosowany przy niedociśnieniu krwi. Obecnie izolowane są z niego substancje, z których produkuje się preparaty przeciwnowotworowe (tzw. taksoidy) używane najczęściej w leczeniu raka jajników (Paclitaxel) oraz w leczeniu raka piersi, płuc, prostaty, żołądka oraz nowotworów głowy i szyi (Docetaksel) [4, 5].

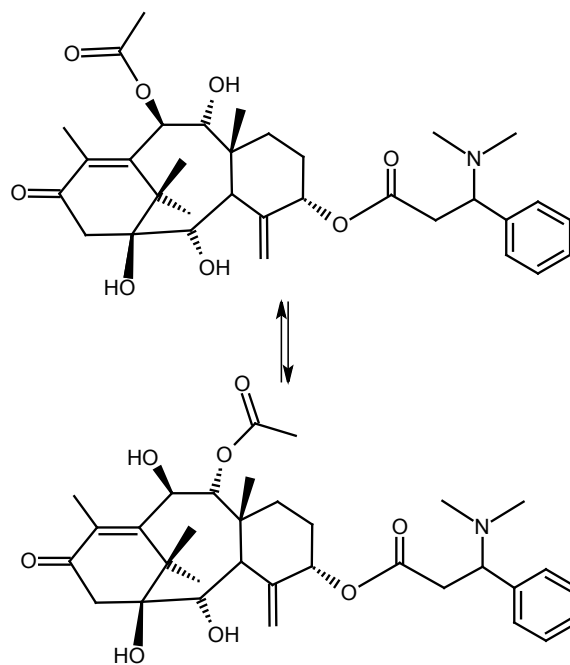
Cis pospolity zawiera również silnie trujące związki. Toksyczność igieł cisa pospolitego była znana od czasów starożytnych, a jego ekstrakt stosowany był zarówno przy samobójstwach, jak i zabójstwach [6, 7]. Grecki lekarz Anazarby

już w I wieku, a rzymski Galenusz w II wieku przestrzegali przed tą morderczą trucizną. Cis uważany był za drzewo złowrózne i groźne, stąd doczekało się wielu opowieści o swojej szkodliwości i było masowo trzebione. Gallowie zatruli sokiem z cisa groty strzał, bądź służył on jako trucizna. Cis według wierzeń egipskich miał rosnąć w Hadesie. Ponadto Juliusz Cezar podaje, że król Gallów Katywulkus otruił się sokiem cisowym po wytopieniu jego plemienia przez Rzymian [8]. Klaudiusz Godenus – rzymski lekarz nazywa cis *podstępna trucizną czyhającą na człowieka i bezrozumne bydło*. W szczególności narażone na nią są konie [9, 10], jeżdżące zimozielone igły cisa. W Grecji był on drzewem śmierci, a u Słowian miał zastosowanie w obrzędach pogrzebowych. W całej Europie panowało przekonanie, że sen pod jego drzewem może okazać się śmiertelny. Ponadto, w medycynie ludowej napar z jego igieł był środkiem stosowanym na poronienie.

Niemal wszystkie części cisa pospolitego, oprócz osnówki, zawierają duże ilości trujących związków, przede wszystkim tzw. taksyn [11]. Zatrucia spowodowane tą rośliną są zazwyczaj przypadkowe. Dawka śmiertelna taksyn dla człowieka zawarta jest w 50-100 g igieł cisa, przy czym spożycie około 50 igieł stwarza już ogromne zagrożenie dla życia zatrutego [12].

Ryc. 3. Migracja grupy acetylowej w obrębie izomerów taksyny B.

Fig. 3. Migration of acetyl group for taxine B and isotaxine B.



Głównym związkiem odpowiedzialnym za toksyczność cisa pospolitego jest taksyna B [7, 13, 14]. Występuje ona w postaci dwóch izomerów różniących się położeniem grupy acetylowej (ryc. 3). Udział każdego z izomerów zależy od zastosowanego rozpuszczalnika [15].

Literatura przedmiotu donosi, iż objawy zatrucia cisem pospolitym występują zwykle po 1-3 godzinach od spożycia [12]. Najwcześniej pojawiają się objawy z przewodu pokarmowego, spowodowane drażniącym działaniem taksyn. Zaliczyć do nich można nudności, wymioty, bóle brzucha. Do innych objawów zatrucia tą rośliną należą zawroty głowy, tachykardia, bradykardia, hipotonia, śpiączka, drgawki i rozszerzenie źrenic. W przypadku zatrucia znacznymi ilościami taksyn możliwy jest zgon, w bardzo krótkim czasie od spożycia, w efekcie niebezpiecznych zaburzeń rytmu i przewodnictwa serca oraz ostrej niewydolności oddechowej [16]. Zaburzenia rytmu i przewodnictwa serca ujawniają się z reguły w ciągu kilku godzin po spożyciu rośliny. Towarzyszą im hipotonia i wstrząs na skutek spadku pojemności minutowej serca, a także wywołanym efektem moczopędnym i depresyjnym oddziaływaniem na OUN [12]. U osób zatrutych cisem charakterystyczne jest występowanie wzmożonej diurezy i hipokaliemii. Jednoczesna utrata potasu z moczem nasila zaburzenia rytmu serca. W opisywanym przypadku zatrucia cisem pospolitym u 15-letniej dziewczyny, zaobserwowane podczas hospitalizacji objawy odpowiadają charakterystycznym objawom opisywanym w piśmiennictwie. Umożliwiło to podjęcie badań toksykologicznych materiałów pobranych ze zwłok, uwzględniających trujące taksyny pochodzenia roślinnego.

Zastosowana metoda izolacji taksyn z igieł cisa pospolitego, a następnie optymalizacji warunków pomiarowych dla izomerycznych form taksyny B, umożliwiła ich identyfikację w materiale biologicznym pobranym od denatki. Ze względu na fakt, iż nie udało się otrzymać wzorca taksyny B i izotaksyny B o znanym stężeniu, ich analiza ilościowa nie była możliwa. Jednakże, porównanie stosunków pików dla taksyny B lub izotaksyny B do diazepam-u-d5, dla poszczególnych ekstraktów z materiałów biologicznych (ryc. 1.), umożliwiło stwierdzenie, iż największe stężenie oznaczanego alkaloidu wykryto we krwi z płuc oraz krwi z serca. Fakt ten może częściowo tłumaczyć toksyczny wpływ taksyn oraz dodatkowo ugruntowuje określoną przyczynę zgonu, jako ostrą niewydolność krążenia, spowodowaną obrzękiem płuc oraz ostrą

rozstrzenią jam serca. Tym samym, opracowana metoda izolacji taksyny B i izotaksyny B z igieł cisa, oczyszczania ekstraktu i identyfikacja metodą HPLC-ESI-MS-MS okazała się użyteczna w praktyce. Podobną metodę zastosował Frommherz [15] z tą różnicą, że taksyny były ekstrahowane z igieł cisa za pomocą 0,5% kwasu siarkowego (VI), a następnie oczyszczane przy użyciu chromatografii cieczowej. Czystość otrzymanych ekstraktów była następnie weryfikowana metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Autor otrzymał w ten sposób roztwór taksyny B o znanym stężeniu, który posłużył do walidacji metody jej oznaczania w próbkach krwi. W podobny sposób postąpił Jenniskens [13] rozdzielając za pomocą chromatografii cieczowej sześć taksyn pochodzących z igieł cisa, a następnie zidentyfikował je przy użyciu metody NMR. Inną metodę zastosował Beike [11], który w celu oczyszczenia otrzymanego ekstraktu, przeprowadził kilkakrotnie ekstrakcję ciecz-ciecz za pomocą etanolu.

W ramach eksperymentu przeprowadzono również badanie stabilności taksyny B w próbkach krwi w trzech temperaturach przechowywania (-20, 4 i 25°C). Zgodnie z ryc. 2. zaobserwowano gwałtowny spadek wartości sygnału analitycznego dla próbek krwi przechowywanych w temperaturze pokojowej (25°C), w przeciwieństwie do próbek przechowywanych w zamrażalce (-20°C), dla których spadek wartości sygnału był dużo mniejszy. Można zatem przypuszczać, iż taksyna B w próbkach krwi nie jest stabilna w temperaturze pokojowej. Przemawia to również za koniecznością przechowywania materiałów biologicznych w niskich temperaturach, w których stabilność alkaloidów z grupy taksyn jest dużo większa.

Opisane literaturowo przypadki zatrucia cisem pospolitym dotyczą prawie wyłącznie prób samobójczych. Łukasik-Głębocka [12] opisuje przypadek 32-letniej kobiety, która podjęła próbę samobójczą, przyjmując około 120 posiekanych igieł cisa pospolitego. Autorka sugeruje, iż wcześniej zastosowana stymulacja endokawitarna może zapobiec rozwojowi nieodwracalnych zaburzeń hemodynamicznych, co może przyczynić się do skutecznego leczenia zaburzeń przewodnictwa i rytmu serca, spowodowanych zatruciem cisem pospolitym. W innej pracy Pietsch [17] opisuje pięć przypadków śmiertelnego zatrucia cisem pospolitym. Sugeruje on wzięcie pod uwagę 3,5-dimetoksyfenolu jako markera śmiertelnych zatruc tą rośliną. Stwierdza on, że stężenie 3,5-dimetoksyfenolu we krwi

przekraczające 300 ng/ml może być przyczyną ostrego zatrucia spowodowanego spożyciem fragmentów cisa pospolitego. Jednakże, jak zauważył Musshoff [18] 3,5-dimetoksyfenol może występować również w innych roślinach i nie może być traktowany jako specyficzny marker zatrucia cistem pospolitym. Frommherz [15] opisuje dwa przypadki śmiertelnego zatrucia cistem pospolitym u 24-letniego mężczyzny i 33-letniej kobiety. Autor oznaczył w ich krwi odpowiednio 174 i 105 ng/g łącznej zawartości dwóch izomerycznych form taksyny B. Opisane są również dwa przypadki zatrucia igłami cisa u koni. W tym wypadku, oznaczone łączne stężenia taksyny B wraz z izotaksyną B wyniosły 212 i 168 ng/g. Brak danych literaturowych, dotyczących stężeń toksycznych dla taksyny B uniemożliwia ilościową ocenę otrzymanych wyników. Obszar badań objętych przedmiotową tematyką jest niezwykle skąpy. Niniejsza praca może mieć zatem istotny przyczynek do poszerzenia bazy danych przypadków śmiertelnego zatrucia cistem pospolitym.

PIŚMIENNICTWO

1. Senata W.: Dendrologia, Część 1, PWN Warszawa, 1991.
2. <http://www.wierzchlas.las.pl/html/gatunek.html>, strona internetowa poświęcona rezerwatu Cisów Staropolskich w Borach Tucholskich, przeglądana dnia 28.11.09.
3. <http://www.lex.com.pl/czasopisma/rejent/obrot.html>, strona internetowa przeglądana dnia 28.08.09.
4. Montero A., Fossella F., Hortobagyi G., Valero V.: Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lancet Oncol.* 2005; 6: 229-239.
5. Navia-Osorio A., Garden H., Cusido R. M., Palazón J., Alfermann A. W., Piñol M. T.: Taxol® and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreaktor. *J. Plant Physiol.* 2002; 159: 97-102.
6. Friese W.: Beitrag zur Kenntnis der Eibe (*Taxus baccata* L.), *Prharm Zentralh* 1951; 90: 259-262, 289-291.
7. Frohne D., Pribilla O.: Tödliche Vergiftung mit *Taxus baccata*. *Arch Toxikol* 1965; 21: 150-162.
8. <http://www.itd.poznan.pl/pl/index.php?id=40> strona internetowa Instytutu Technologii Drewna w Poznaniu, opracowana przez doc. dr. inż. Stanisława Szaław-Neymana, przeglądana dnia 28.11.09.
9. Tiwary A. K., Puschner B., Kinde H., Tor E. R.: Diagnosis of *Taxus* (yew) poisoning in a horse. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 252-255.
10. Kite C., Lawrence T. J., Dauncey E. A.: Detecting *Taxus* poisoning in horse using liquid chromatography/mass spectrometry. *Vet Hum Toxicol* 2000; 42: 151-154.
11. Beike J., Karger B.: LC-MS determination of *Taxus* alkaloids in biological specimens, *Int J Legal Med* 2003; 117: 335-339.
12. Łukasik-Głębocka M., Sieńko A., Klimaszek D., Mańkowski W.: Skuteczne zastosowanie stymulacji endokrwiennnej w leczeniu zaburzeń przewodnictwa i rytmu serca w przebiegu zatrucia cistem pospolitym. *Przegl. Lek.* 2007; 64: 4-5.
13. Jenniskens L., Rozendaal E., van Beek T.: Identification of six taxine alkaloids from *Taxus baccata* needles. *J Nat Prod* 1996; 59: 117-123.
14. Bauereis R., Steiert W.: Pharmakologische Eigenschaften von Taxin A und B. *Arzneim Forsch* 1959; 9: 77-79.
15. Frommherz L., Kintz P., Kijewski H.: Quantitative determination of Taxine B in body fluids by LC-MS-MS. *Int J Legal Med.* 2006; 120: 346-351.
16. Micromedex: Poisindex 2002, vol. 113 (komputerowa baza danych).
17. Pietach J., Schulz K., Schmidt U., Andresen H., Schwarze B., Dreßler J.: A comparative study of five fatal cases of *Taxus* poisoning. *Int J Legal Med* 2007; 121: 417-422.
18. Musshoff F., Madea B.: Modern analytical procedures for the determination of taxus alkaloids in biological material. *Int J Legal Med* 2008; 122: 357-358.

Adres pierwszego autora:

Mgr Karol Kula

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej UJ CM
ul. Grzegórzecka 16, 31-531 Kraków