

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Karel Musil

**VÝVOJ HPLC-DAD-MS/MS METODY PRO STANOVENÍ
VYBRANÝCH TOXINŮ V MUCHOMŮRCE ZELENÉ**

**Development of HPLC-DAD-MS/MS method for determination of
selected toxins in *Amanita phalloides***

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Zuzany Bosákové, CSc.

Konzultant: Ph.D RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Doc. RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Diplomová práce

Praha 2015

Prohlášení

Tato práce byla vypracována na Katedře analytické chemie, Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze pod vedením školitelky Doc. RNDr. Zuzany Bosákové, CSc.

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

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 13.5.2015

.....

Abstrakt (CZ)

Tato práce byla zaměřena na vývoj a optimalizaci analytické metodiky, pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí diodovým polem (HPLC-DAD) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí diodovým polem a tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-DAD-MS/MS), pro stanovení amatoxinů (α - a β -amanitinu) a falotoxinů (falacidinu a faloidinu) v hrubém extraktu z kloubouku muchomůrky zelené. S cílem zaručit spolehlivost analytických výsledků byl studován vliv různých parametrů na kvalitu separace a samotné stanovení. Vyvinutá metoda HPLC-DAD dosahuje dobré linearitě v rozmezí koncentrací 1 – 100 $\mu\text{g/ml}$, kdy korelační koeficienty pro obě kalibrační závislosti všech sledovaných látek jsou vyšší než 0,997. Pro stanovované toxiny byly vypočteny limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), pro α -amanitin 0,90 $\mu\text{g/ml}$ (LOD); 2,99 $\mu\text{g/ml}$ (LOQ), β -amanitin 1,07 $\mu\text{g/ml}$ (LOD); 3,56 $\mu\text{g/ml}$ (LOQ), falacidin 2,17 $\mu\text{g/ml}$ (LOD); 7,26 $\mu\text{g/ml}$ (LOQ) a faloidin 0,79 $\mu\text{g/ml}$ (LOD); 2,64 $\mu\text{g/ml}$ (LOQ).

Klíčová slova: muchomůrka zelená, α -amanitin, β -amanitin, falacidin, faloidin, extrakce tuhá látka-kapalina, HPLC-DAD, HPLC-DAD-MS/MS

Abstract (EN)

This work has been focused on the development and optimization of analytical methodology, using high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometric detection (HPLC-DAD-MS/MS) for the determination of amatoxins (α - and β -amanitin) and phalotoxins (phalloidin and phalloidin) in the crude extract from cap of *Amanita phalloides* with the option to later use for clinical purposes. In order to guarantee the reliability of the analytical results the influence of various parameters on the quality of the separation and the determination of toxins was studied. The developed HPLC-DAD method achieves good linearity in the concentrations range 1 – 100 $\mu\text{g/ml}$, with correlation coefficients higher than 0,997. Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were calculated for all the studied toxins with following values: for α -amanitin 0,90 $\mu\text{g/ml}$ (LOD); 2,99 $\mu\text{g/ml}$ (LOQ), β -amanitin 1,07 $\mu\text{g/ml}$ (LOD); 3,56 $\mu\text{g/ml}$ (LOQ), phalloidin 2,17 $\mu\text{g/ml}$ (LOD); 7,26 $\mu\text{g/ml}$ (LOQ) and phalloidin 0,79 $\mu\text{g/ml}$ (LOD); 2,64 $\mu\text{g/ml}$ (LOQ).

Key words: *Amanita phalloides*, α -amanitin, β -amanitin, phalloidin, phalloidin, solid-liquid extraction, HPLC-DAD, HPLC-DAD-MS/MS

Poděkování

Zde bych rád poděkoval mé školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za profesionální a vstřícné jednání, přátelskou atmosféru, příjemné pracovní prostředí, ochotu kdykoli pomoci a poskytnout užitečnou radu po celou dobu zpracování této diplomové práce. Poděkování patří také RNDr. Petrovi Kozlíkovi, Ph.D. za ochotu pomoci, za poskytování cenných informací a rad.

Dále bych rád poděkoval také RNDr. Jaroslavu Klánovi, CSc. za udělení potřebných informací a rad ohledně řešené problematiky, bez kterého by tuto práci nebylo možné uskutečnit.

V poslední řadě bych chtěl poděkovat rodičům a mým nejbližším za podporu během celého studia.

Obsah

1 Úvod	11
1.1 Houbové intoxikace	11
1.2 Cíle práce.....	12
2 Teoretická část	13
2.1 Houby rodu <i>Amanita</i>	13
2.1.1 Muchomůrka zelená (<i>Amanita phalloides</i>)	13
2.1.2 Příznaky a průběh otravy muchomůrkou zelenou	15
2.2 Toxiny muchomůrky zelené.....	15
2.2.1 Amatoxiny	16
2.2.2 Falotoxiny	17
2.3 Příprava a úprava reálných vzorků.....	18
2.3.1 Přímá extrakce	19
2.3.2 Extrakce na pevné fázi	20
2.4 Metody stanovení toxinů muchomůrky zelené	21
2.5. Kapalinová chromatografie	21
2.5.1 Účinnost separace v LC	22
2.5.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	24
2.5.2.1 Chromatografie s normální fází.....	25
2.5.2.2 Chromatografie s obrácenou fází.....	25
2.6 Detekce v kapalinové chromatografii	26
2.6.1 Detektor diodového pole	27
2.7. Detekce hmotnostní spektrometrií	27
2.7.1 Ionizace elektrosprejem	27
2.7.2 Kvadrupólový analyzátor	28
2.7.3 Trojitý kvadrupólový analyzátor	28
2.8 Vyhodnocení výsledků HPLC analýz	29
2.8.1 Kvalitativní hodnocení	29
2.8.1.1 Retenční charakteristiky	30
2.8.2 Kvantitativní hodnocení.....	30
2.8.2.1 Metoda vnějšího standardu	31
2.8.2.2 Limit detekce a limit kvantifikace.....	32

3. Experimentální část	33
3.1 Chemikálie.....	33
3.2 Instrumentace	33
3.3 Extrakce toxinů muchomůrky zelené	34
3.3.1 Pilotní extrakce	34
3.3.1.1 První krok extrakce.....	34
3.3.1.2 Druhý krok extrakce	35
3.3.2 Extrakce za částečně optimalizovaných podmínek.....	35
3.3.2.1 První krok extrakce a kinetika extrakce	35
3.3.2.2 Druhý krok extrakce za částečně optimalizovaných podmínek.....	36
3.4 Příprava vzorků pro HPLC analýzy	36
3.4.1 Příprava standardů a kalibračních roztoků	36
3.4.2 Příprava reálných vzorků pro analýzy	36
3.5 Kvalitativní hodnocení	37
3.6 Kvantitativní hodnocení.....	37
4. Výsledky a diskuze	38
4.1 Optimalizace HPLC separace.....	38
4.1.1 Výběr organického modifikátoru mobilní fáze	38
4.1.2 Optimalizace pH vodné složky mobilní fáze	40
4.1.3 Optimalizace gradientové eluce.....	43
4.1.4 Testování termodynamiky a kinetiky separace	45
4.2 Kvantitativní hodnocení HPLC-DAD analýz.....	47
4.3 Optimalizace extrakce	50
4.3.1 Hodnocení pilotní extrakce	52
4.3.2 Hodnocení extrakce za částečně optimalizovaných podmínek	55
4.3.3 Kinetika extrakce.....	56
4.4 Stanovení toxinů muchomůrky zelené.....	58
4.5 Analýzy metodou HPLC-DAD-MS/MS.....	60
5. Závěr	65
6 Literatura	67

Seznam zkratek a použitých symbolů

Ala	alanin
Asn	asparagin
Asp	kyselina asparagová
C18	oktadecyl
C4	butyl
C8	oktyl
CE	kolizní energie (z angl. „Collision energy“)
CI	chemická ionizace (z angl. „Chemical ionization“)
Cys	cystein
CZE	kapilární zónová elektroforéza (CZE, z angl. „Capillary-zone electrophoresis“)
D	kyselina asparagová
DAD	detektor diodového pole (z angl. „Diode array detector“)
EI	ionizace elektronovým paprskem (z angl. „Electron ionization“)
ELISA	ELISA (z angl. „Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay“),
ESI	ionizace elektrosprejem (z angl. „Electrospray ionization“)
GC	plynová chromatografie (z angl. „Gas chromatography“)
Gly	glycin
<i>H</i>	výškový ekvivalent teoretického patra kolony
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (HILIC, z angl. „Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography“)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. „High-performance liquid chromatography“)
HPLC-DAD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí diodovým polem
HPLC-DAD-MS/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí diodovým polem s tandemovou hmotnostní spektrometrií
IAE	imunoafinitní extrakce (IAE, z angl. „Immunoaffinity extraction“)
Ile	isoleucin

IT	iontová past (IT, z angl. „Ion Trap“)
k_i	retenční faktor
LC	kapalinová chromatografie (z angl. „Liquid chromatography“)
LD ₅₀	střední smrtná dávka
Leu	leucin
LLE	extrakce kapalina-kapalina (z angl. „Liquid-liquid extraction“)
LOD	limit detekce (mez detekce, LOD, z angl. „Limit of Detection“)
LOQ	limit kvantifikace (mez stanovitelnosti, LOQ, z angl. „Limit of Quantification“)
M	molekulová hmotnost
m/z	poměr hmotnost/náboj iontu
MALDI	ionizace laserem za spoluúčasti matrice (z angl. „Matrix-assisted laser desorption/ionization“)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. „Mass spectrometry“)
N	počet teoretických pater kolony
NMR	nukleární magnetická rezonance
NP-HPLC	chromatografie s normální fází (z angl. „Normal-phase HPLC“)
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
Ph	fenyl
Pro	prolin
Q	kvadrupólový analyzátor (Q, z angl. „Quadrupole“)
QqQ	trojitý kvadrupólový analyzátor (TQ, z angl. „Triple Quadrupole“)
$R_{1,2}$	rozlišení píků
RIA	radioimunoanalýza (RIA, z angl. „radioimmunoassay“)
RP-HPLC	chromatografie na reverzní fází (z angl. „Reverse-phase HPLC“)
RPM	otáčky za minutu (z angl. „Rotation per minute“)
RT	laboratorní teplota (z angl. „Room temperature“)
SPE	extrakce na pevné fázi (z angl. „Solid-phase extraction“)

Thr	threonin
TIC	celkový iontový proud (z angl. „Total ion current“)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. „Thin-layer chromatography“)
t_M	mrtvý čas
TOF	průletový analyzátor (z angl. „Time-of-flight“)
t_R	retenční čas
Trp	tryptofan
TQ	trojitý kvadrupólový analyzátor (QqQ, z angl. „Triple Quadrupole“)
u	lineární průtoková rychlost mobilní fáze
UPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (z angl. „Ultra-performance liquid chromatography“)
UV/VIS	ultrafialové/viditelné záření (z angl. „Ultraviolet/Visible“)
Val	valin
z	náboj iontu
α	selektivita

1. Úvod

1.1 Houbové intoxikace

Na celém světě existuje více než 5000 identifikovaných makromycetů hub a z toho pouze 400 (500) druhů vykazuje toxické účinky [1 – 3]. Každoročně dochází ve světě i v České republice k řadě houbových intoxikací. Z hlediska otrav houbami je nejvýznamnější a nejnebezpečnější rod *Amanita* (muchomůrky). Mezi nejznámější zástupce tohoto rodu působící závažné otravy patří muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*), muchomůrka jízlivá (*Amanita virosa*) a muchomůrka tygrovaná (*Amanita pantherina*). K otravám dochází většinou omylem při sběru hub, kdy je jedovatá houba pro svoji podobnost zaměněna s houbou jedlou. Najdou se však i případy intoxikací, kdy jsou houby pro svůj obsah látek s psychotropními účinky zneužívány cíleně, zejména mladými lidmi. Z rodu *Amanita* je nejčastěji pro tento účel zneužívána muchomůrka červená (*Amanita muscaria*) [4].

Riziko otravy záměnou za jedlý druh houby hrozí u muchomůrky tygrované a především u muchomůrky zelené. Muchomůrka tygrovaná bývá zaměňována za jedlou muchomůrku růžovku (*Amanita rubescens*). Muchomůrka zelená se většinou při sběru hub zamění s pečárkami (žampiony) a některými druhy holubinek např. holubinkou nazelenalou nebo holubinkou trávozelenou. Nejnebezpečnější ze zmíněných hub je muchomůrka zelená, která způsobuje smrtelné otravy díky obsahu jedovatých falotoxinů a zejména amatoxinů. Tyto toxiny negativně působí na jaterní a ledvinové buňky [5]. Uvádí se, že tyto toxiny muchomůrky zelené jsou zodpovědné za více než 90 % smrtelných případů způsobených otravou houbami [6 – 8]. O závažnosti svědčí také to, že 10 - 40 % otrav právě touto houbou končí smrtí [9].

K vyšetření houbových otrav se v současnosti v České republice využívá subjektivní metody, založené na mikroskopické identifikaci houbových spor. Tato metoda v sobě zahrnuje řadu úskalí, počínaje nevhodným odběrem vzorku (např. špatný odběr žaludečního obsahu, kdy je k vyšetření dodán čirý výplach po lavážích žaludku, již bez přítomnosti spor) až po nedostatečnou erudovanost odborníka, který vyšetření provádí [4]. Navíc vzhledem k průběhu otrav, které jsou doprovázeny těžkými průjmy spojenými se zvracením a dehydratací [8,10,11] je možné, že člověk před samotným vyšetřením a odběrem spory ze svého těla vyloučil a vyšetření k identifikaci původce otravy nebude možné.

S rozvojem moderních chromatografických metod je snaha zapojit vhodné analytické postupy do rutinní toxikologické praxe k objektivní diagnostice houbových intoxikací, což v současné době v naší republice stále ještě chybí [4].

1.1.2 Cíle práce:

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout metodu HPLC-DAD-MS/MS pro stanovení vybraných toxinů (α -amanitinu, β -amanitinu, falacidinu a faloidinu) v muchomůrce zelené. Prvním krokem byl vývoj extrakční metody s co nejvyšší účinností extrakce pro kvantitativní stanovení. Dalším krokem bylo nalezení optimálních podmínek separace využitím HPLC-DAD instrumentace. Analýzy stanovení byly provedeny za optimalizovaných podmínek metodou HPLC-DAD a výsledky byly potvrzeny analýzami metodou HPLC-DAD-MS/MS.

2. Teoretická část

2.1 Houby rodu *Amanita*

Rod *Amanita*, muchomůrky, patří do čeledi hub muchomůrkovitých (*Amanitaceae*) spadající do skupiny stopkovýtrusných (*Basidiomycota*). Kromě jedlých zástupců tento rod obsahuje několik smrtelně jedovatých hub, zejména muchomůrku zelenou (*Amanita phalloides*), muchomůrku jízlivou (*Amanita virosa*) a muchomůrku jarní (*Amanita verna*) [5]. Podle odborné literatury se tomuto rodu připisuje více než 80 % případů otrav způsobených houbami [6, 12, 13].

2.1.1 Muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*)

Muchomůrka zelená, někdy nazývaná muchomůrka hlíznatá, je nejjedovatější známou houbou [4, 14, 15], která každoročně způsobuje otravy končící trvalým poškozením některých orgánů, zejména jater a ledvin nebo dokonce smrtí intoxikovaného subjektu. Otravy vznikají nejčastěji jejím zaměněním za jedlou houbu (pečárky, některé druhy holubinek) [4].

Rizikovým faktorem při určování této houby bývá zbarvení jejího kloubouku. Škála zbarvení je velmi široká od bledě zelené (téměř bílé) až do tmavě hnědé, u typické formy je zelená, obvykle radiálně žíhaná (viz obr. 1). Vzácně se lze setkat s odrůdou *Amanita phalloides* var. *alba*, která je celá bílá (obr. 2). Pokožka kloubouku je slupitelná, má hladký povrch se slabým odleskem. Velikost kloubouku se u dospělé plodnice pohybuje mezi 6 – 12,5 cm. U dospělých plodnic je kloubok plochý trochu sklenutý, u mladých exemplářů je kuželovitý. V samém počátku vývoje plodnice je tvar až kulovitý. Lupeny jsou vždy bílé, dužnina je také bílá a ani po poškození se barva nemění a má příjemnou vůni. Třeň je bílý, hladký, 10-15 cm vysoký a směrem dolů se rozšiřuje. V horní části třeně se nachází prsten, který bývá rýhovaný, ale nemusí to být pravidlem. Třeň je pak zakončen výraznou hlízou, která je obalena bílou pochvou. Této části muchomůrky se někdy říká "kalich smrti". Muchomůrka zelená dává přednost teplejšímu klimatu. Lze ji nalézt ve smíšených a listnatých lesích, obzvláště pak v přítomnosti dubů. V mírném pásu roste od června do října, a to nejčastěji ve velkých skupinách. Je rozšířená v celé Evropě a severní Africe. Méně často se vyskytuje v Severní Americe nebo Austrálii [5, 8, 11].



Obr. 1. – Muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*) [10]



Obr. 2. – Bílá forma muchomůrky zelené (*Amanita phalloides* var. *alba*) [10]

2.1.2 Příznaky a průběh otravy muchomůrkou zelenou

Příznaky otravy se objevují po poměrně dlouhé době po požití a průběh otravy lze rozdělit do dvou fází. První příznaky se objevují 6 - 24 hodin po požití a nastává první fáze intoxikace. Ta trvá přibližně 24 hodin a je charakteristická profusními průjmy spojenými s iontovou dysbalancí, mírným zvracením, bolestmi břicha a hypoglykemií. Za tuto první fázi otravy jsou odpovědné falotoxiny a její průběh lze jednoduše popsat jako „syndrom cholery“ [5].

Po první fázi nastává zdánlivě bezpříznakové období, trvající asi 24 hodin, spojené s náhlým zlepšením zdravotního stavu a vymizením příznaků. Během této doby jsou působením amatoxinů (zejména α -amanitinu) vážně poškozeny hepatocyty a rovněž dochází i k postupnému poškození ledvin [5, 8]. Stupňování jakéhokoli poškození je doprovázeno slabostí, všeobecným zhoršením zdravotního stavu a ikterem. Celková nekróza jaterních buněk vede k selhání jater a kromě toho je vážným způsobem porušena funkce ledvin [3, 6]. Po požití většího množství houby či bez léčby nakonec dochází k úmrtí 4. - 7. den po intoxikaci na následky selhání jater a edému mozku [16, 17]. Pokud je poškození jater vážné, je nutné k přežití pacienta provést jejich transplantaci [1, 8, 16, 18].

2.2 Toxiny muchomůrky zelené

Toxiny muchomůrky zelené jsou bicycklé peptidy a lze je rozdělit do tří skupin, a to na amatoxiny, falotoxiny a falolysiny [4]. Jsou to bílé až slabě nažloutlé krystalické nebo amorfní látky polárního charakteru bez chuti i zápachu. Po rozpuštění tvoří bezbarvé roztoky. Snadno se rozpouští v methanolu, dimethylsulfoxidu a pyridinu. O něco méně rozpustné jsou pak v ethanolu, ve vodě a ještě o něco méně ve vyšších alkoholech [17].

Toxicita je však spjata jen s falotoxiny a především amatoxiny, které jsou z klinického hlediska nejdůležitější [19, 20]. Na rozdíl od jiných známých houbových cycklých peptidů jsou amatoxiny a falotoxiny biosyntetizovány na ribozomech [13].

Jsou brány jako sekundární metabolity této houby. To znamená, že celkové množství toxinů se během ontogeneze plodnic mění. Mladší plodnice obsahuje toxiny v nižších koncentracích než dospělá, plně vzrostlá plodnice. Rovněž distribuce toxinů v různých částech dospělé plodnice je kvantitativně různá. [21]. Mezi jedinci rostoucími ve stejném regionu však existuje velká variabilita v zastoupení toxinů.

Přestože jsou vyjmenované skupiny toxinů dominantní ve druzích *Amanita* (jako jsou *A. phalloides*, *A. verna*, *A. virosa*), lze je nalézt i u jiných druhů hub. Přítomnost toxinů byla

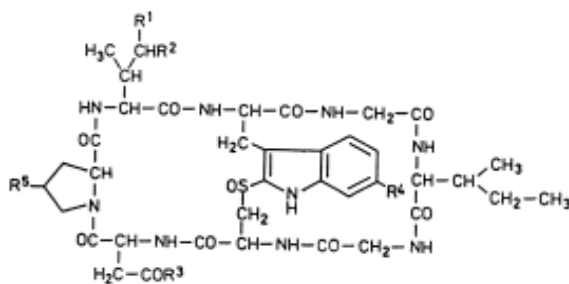
prokázána například u některých zástupců druhů bedel (*Lepiota*) nebo čepičatek (*Galerina*) [17, 22].

2.2.1 Amatoxiny

Amatoxiny je souhrnný název pro skupinu toxinů zahrnující α -, β -, γ -, a ε -amanitin, amanin a amanulin (netoxický) a další látky. Strukturou se jedná o bicycké oktapeptidy (viz obr. 3.) vyznačující se vysokou termostabilitou. Toxiny se rozkládají až při teplotách vyšších než 250 °C a nelze je tedy rozložit pouhým vařením [3, 17]. Proto i po tepelné úpravě houbových pokrmů, pokud obsahují tyto toxiny, dochází k otravě. Stejně tak dochází k otravám v případech, kdy jsou houby zamrazeny i po dobu několika měsíců a jsou zpracovány později [23].

Struktura amatoxinů obsahuje aminokyselinové sekvence Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asn-Pro (α -amanitin) nebo Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asp-Pro (β -amanitin). Ty jsou pak cyklizované způsobem „hlava k ocasu“ peptidovou vazbou a obsahují nezvyklý tryptathioninový můstek mezi tryptofanovým a cysteinovým zbytkem. Další rozdíly mezi amatoxiny jsou dány rozdíly v hydroxylaci bočních řetězců, které zahrnují 4-hydroxyprolin, γ -dihydroxyisoleucin, δ -dihydroxyisoleucin a 6-hydroxytryptofan [24]. Na rozdíl od falotoxinů se amanitiny vstřebávají v gastrointestinálním traktu. Z hlediska otrav je nejdůležitější β -amanitin a především α -amanitin. Podle doby projevu toxického účinku se jedná o pomalu působící jedy, které jsou 10 až 20 krát více toxické než falotoxiny a tím jsou zodpovědné za vlastní klinickou otravu. Po intoxikaci se amanitiny vážou na albumin, což vede k rychlé absorpci a distribuci v těle [17-20].

V eukaryotních organismech působí amanitiny (hlavně však α -amanitin) na proteosyntézu buněk, a to především hepatocytů (jaterní buňky) [25, 26]. V jádru buňky se amanitin váže v komplex s RNA polymerasou II, čímž inhibuje její funkci, a to již při velmi nízkých koncentracích (10^{-9} mol/l). To vede k zastavení proteosyntézy, k nekróze buněk a následně k selhání jater. Kromě jater jsou dalším nejvíce postiženým orgánem ledviny [5, 4, 11, 17, 27].



Compounds	S u b s t i t u e n t s					LD ₅₀ (mg/kg)
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	
α -Amanitin	CH ₂ OH	OH	NH ₂	OH	OH	0,3
β -Amanitin	CH ₂ OH	OH	OH	OH	OH	0,5
γ -Amanitin	CH ₃	OH	NH ₂	OH	OH	0,2
ε -Amanitin	CH ₃	OH	OH	OH	OH	0,3
Amanin	CH ₂ OH	OH	OH	H	OH	0,5
Amanin amide	CH ₂ OH	OH	NH ₂	H	OH	0,3
Amanullin	CH ₃	H	NH ₂	OH	OH	20
Amanullinic acid	CH ₃	H	OH	OH	OH	20
Proamanullin	CH ₃	H	NH ₂	OH	H	20

Obr. 3.: Chemická struktura a hodnoty LD₅₀ pro amatoxiny [11]

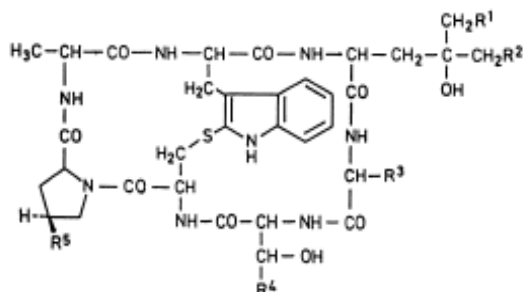
2.2.2 Falotoxiny

Falotoxiny jsou další skupinou toxinů muchomůrky zelené. Z chemického hlediska se jedná o bicycké heptapeptidy, které mají stejnou termorezistenci jako amatoxiny [17, 23]. Do této skupiny patří faloidin, falacidin, falisacin, faloin, falin a jiné (viz obr. 4.) [11]. U faloidinu a falacidinu je základem následující sekvence aminokyselin Ala-Trp-Leu-Ala-D-Thr-Cys-Pro a Ala-Trp-Leu-Val-D-Asp-Cys-Pro. Různorodost mezi falotoxiny, stejně jako u amatoxinů, je způsobena rozdíly v hydroxylaci bočních řetězců [24]. Na rozdíl od amatoxinů se falotoxiny nevstřebávají v gastrointestinálním traktu, takže se nepodílí na aktivní klinické otravě. Nicméně působí na epitelové buňky (euterocyty) v tenkém a tlustém střevě, a jak bylo prokázáno na potkanech, při intravenózním podání mají podobné účinky jako amatoxiny [4, 17].

Největší význam z vyjmenovaných toxinů má faloidin. Faloidin není vstřebáván buňkami, ale váže se specificky na F-aktin buněčných membrán a zamezuje tak konverzi F-aktinu na G-aktin. Rovnováha mezi F-aktinem a G-aktinem je důležitá pro správný chod buněk a její

narušení vede k porušení buněčných procesů. Dalším zástupcem falotoxinů je falacidin. Ten jako derivát faloidinu má podobné vlastnosti i toxický účinek jako faloidin [5, 17, 18, 28,].

Fluorescenční konjugáty falotoxinů našly i své využití. Používají se jako reakční činidla k vymezení aktinového cytoskeletu [24].



Compounds	Substituents					LD ₅₀ (mg/kg)
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	
Phalloidin	OH	H	CH ₃	CH ₃	OH	2,0
Phalloin	H	H	CH ₃	CH ₃	OH	1,5
Prophallin	H	H	CH ₃	CH ₃	H	100
Phallisin	OH	OH	CH ₃	CH ₃	OH	2,5
Phallacin	H	H	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH	1,5
Phallacidin	OH	H	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH	1,5
Phallisacin	OH	OH	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH	4,5

Obr. 4.: Chemická struktura a hodnoty LD₅₀ pro falotoxiny [11]

2.3 Příprava a úprava reálných vzorků

Proces přípravy a úpravy vzorku ve velké míře ovlivňuje výslednou přesnost a správnost stanovení. Nutným krokem předcházejícím chromatografické analýze houbových toxinů, je jejich extrakce z biologického materiálu, v tomto případě z plodnice houby. Reálné vzorky však nejsou většinou přímo kompatibilní s metodami, kterými mají být ve finálním kroku analyzovány. Důvodem je velmi složitá matrice, ze které jsou analyty extrahovány. Získaný vzorek (extrakt) kromě analytů obsahuje i mnoho nečistot a interferujících látek, které mohou ovlivnit jejich stanovení.

Extrakty biologických či rostlinných materiálů a dalších je proto nutné před samotnou analýzou upravit za účelem izolace analytu, jeho zakoncentrování či samotného přečistění

hrubých extraktů od balastních látek. Prekoncentrací a purifikací vzorku lze dosáhnout zvýšení citlivosti metody a spolehlivosti stanovení analyzovaných látek [29].

Volba úpravy vzorku probíhá v závislosti na matici. Nejčastěji používané metody extrakce houbových toxinů jsou přímá extrakce tuhého materiálu (houby) kapalinou, extrakce kapalina-kapalina (LLE, z angl. „Liquid-liquid extraction“) nebo extrakce na pevné fázi (SPE, z angl. „Solid-phase extraction“). Pro extrakci toxinů muchomůrky zelené je dle literatury převážně využíváno přímé extrakce (extrakce tuhá látka-kapalina) [2, 17, 19, 24, 30, 31] a přečistění extraktů pomocí SPE [28, 32].

K extrakci z biologických materiálů jako je krevní plasma nebo moč se využívá především SPE [4, 6, 16, 33]. Je ale možné využít i metody imunoafinitní extrakce (IAE, z angl. „Immunoaffinity extraction“) [9, 29].

2.3.1 Přímá extrakce

Přímou extrakcí se obvykle rozumí extrakce analytu z tuhého materiálu. Tento postup lze také označit jako extrakce tuhá látka-kapalina. Účinnost a průběh extrakce tohoto typu jsou ovlivněny především úpravou vzorku před samotnou extrakcí. Pro vysokou účinnost je potřeba, aby byl vzorek důkladně rozmělněn (drcením, třením) a homogenizován. Z takto připraveného vzorku jsou pak analyty oproti kompaktní matici extrahovány mnohem rychleji a efektivněji. Kromě úpravy vzorku je pro extrakci rozhodující i volba extrakčního činidla (rozpouštědla) [29].

Jako extrakční činidla k extrakci polárních látek jsou používána polární rozpouštědla. Nejčastěji se jedná o směsi voda – organické rozpouštědlo (methanol, acetonitril, aceton). Místo vody je možné použít i pufr. Při výběru organické složky extrakčního rozpouštědla je brán zřetel na chemické a fyzikální vlastnosti analytu (rozpustnost, rozdělovací koeficient a další). Methanol a acetonitril jsou rozpouštědla střední polaritě ve kterých je rozpustná většina analytů. Ke zvýšení polaritě extrakčního rozpouštědla se pak používá jejich směs s vodou. Voda je však velmi polární rozpouštědlo a omezeně se v ní rozpouští i látky nepříznivě ovlivňující stanovení. Příkladem takovýchto látek může být škrob. U látek vykazující acidobazické vlastnosti lze úpravou pH extrakčního činidla zvýšit jejich rozpustnost v daném rozpouštědle a tím i účinnost extrakce [29].

V praxi se extrakce provádí v uzavřené nádobě za použití horizontální rotační laboratorní třepačky nebo s použitím ultrazvukové lázně. Pokud je vzorek před extrakcí důkladně

rozmělněn, dosahuje extrakce tuhá látka kapalina dobrých výsledků. Zejména když při extrakci dochází k rozpouštění menšího či většího množství matrice, která je práškovitá či porézní. Rozpuštěná matrice však může způsobit další problémy při vlastním stanovení. Výhodou této extrakční techniky je jednoduchost a nenáročnost na laboratorní vybavení. Nevýhodou pak může být velká spotřeba rozpouštědel, možné ztráty při extrakci, způsobené adsorpcí analytu na povrch matrice či stěny extrakční nádoby, a někdy i časová náročnost extrakce [29].

2.3.2 Extrakce na pevné fázi

Extrakce pomocí SPE je asi nejpoužívanější technikou pro extrakci a úpravu vzorků vůbec. Ve srovnání s přímou extrakcí přináší mnoho výhod, jako např. výrazně nižší spotřebu rozpouštědel, vyšší reprodukovatelnost či možnost automatizace.

Jednoznačnou výhodou této techniky je, že dochází k čištění vzorku během extrakce. Zároveň pokud je citlivost metody, použité ke stanovení látek nedostačující, je možné touto technikou vzorek zakoncentrovat a tím citlivost metody zvýšit. Nevýhodou bývá jednorázová použitelnost SPE kolonek, což vede k zvýšení nákladů [29, 34].

Principem SPE je zachytávání analytu nanášeného v kapalně fázi na fázi stacionární (sorben) na základě různých interakcí analytu a stacionární fáze. Selektivita extrakce je dosažena chemickou povahou použitého sorbentu, volbou kapalně fáze či úpravou vzorku na požadovanou hodnotu pH. V dnešní době existuje na trhu široká řada sorbentů (stacionární fáze). Nejčastěji se jedná o sorbenty na bázi silikagelu či polymerního sorbentu s chemicky vázanými skupinami různé povahy. Příkladem takových skupin můhou být: nepolární - oktyl (C8), oktadecyl (C18), fenyl (Ph); polární - aminopropyl, diol, kyano; iontoměniče (katexy i anexy) a v neposlední řadě i afinitní materiály pro imunoadsorpci [34]. Novým trendem na poli SPE jsou pak tzv. vícemodální sorbenty, které obsahují více druhů funkčních skupin s odlišnými vlastnostmi např. C18 společně s iontově-výměnou skupinou a jiné [29].

2.4 Metody stanovení toxinů muchomůrky zelené

Toxiny muchomůrky zelené budí pozornost již od poloviny minulého století a k jejich stanovení bylo vyvinuto několik metod. Prvotní metody zahrnovaly spektrofotometrická nebo kolorimetrická stanovení, kterými však bylo možné stanovit pouze jeden z toxinů [30]. Další metody využívaly fluorescence toxinů po komplexaci [35].

V pozdější době se začlo využívat chromatografických technik jako je tenkovrstvá chromatografie (TLC, z angl. „Thin-layer chromatography“) [17, 31, 36, 37]. V poslední době je využíváno hlavně vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, z angl. „High-performance liquid chromatography“) pracující v revezním separačním módu s UV/VIS detekcí [4, 6, 17, 30, 38, 39]. Jedním z důvodů je také to, že jak amatoxiny, tak falotoxiny jsou netěkavé látky s poměrně vysokou molekulovou hmotností a nesplňují tak podmínky pro stanovení plynovou chromatografií (GC, z angl. „Gas chromatography“) [40].

Nově se objevuje i stanovení pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UPLC, z angl. „Ultra-performance liquid chromatography“) [16], hydrofilní interakční chromatografie (HILIC, z angl. „Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography“) [41] nebo kapilární zonové elektroforézy (CZE, z angl. „Capillary-zone electrophoresis“) [42, 43, 44].

Kromě instrumentálních metod bylo ke stanovení také využito imunologických metod jako je ELISA (z angl. „Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay“), komerčně dostupných radioimunoafinitních kitů (RIA, z angl. „radioimmunoassay“) nebo genetických metod [17, 42, 45, 46]. Imunologické metody se však potýkají s krátkou dobou životnosti protilátek, sloužících k detekci toxinů.

2.5 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC, z angl. „Liquid chromatography“) se řadí do kategorie separačních metod, při které dochází k rozdělování (separování) vlivem rozdílné distribuce látek obsažených ve vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Tyto fáze se označují jako fáze stacionární (nepohyblivá) a mobilní (pohyblivá), kterou je u LC, jak plyne z názvu, kapalina. Látky obsažené ve vzorku mohou se stacionární fází různě interagovat. Interakce se stacionární fází a jejich síla se u různých látek liší. Na základě toho dochází k rozdílnému zadržování látek stacionární fází a tím k separaci složek ve vzorku [47, 48].

2.5.1 Účinnost separace v LC

Cílem každé metody je dosáhnout co nejlepší separace látek v co nejkratším čase. V LC, stejně jako v jiných separačních technikách, je účinnost posuzována podle schopnosti separovat složky, které jsou obsaženy ve vzorku. V LC je jako ukazatel kvality chromatografické separace definována účinnost kolony, charakterizující míru rozšíření elučních zón látek dělených na koloně [49]. Účinnost kolony roste a klesá s její schopností od sebe separovat složky ve směsi. Účinnost kolony je bezrozměrnou veličinou vyjádřenou tzv. počtem teoretických pater kolony N . Účinnost kolony lze vyjádřit rovnicí č. 1, kde t_R je retenční čas a w šířka píku při základně [47, 48].

Jelikož míra separace je úměrná délce kolony, byl pro porovnávání účinnosti kolon o různé délce zaveden tzv. výškový ekvivalent teoretického patra H . Výškový ekvivalent teoretického patra kolony je podílem její délky L a počtu teoretických pater kolony N (rovnice č. 2). Z toho vyplývá, že účinnost kolony klesá s výškou teoretického patra a naopak roste s počtem teoretických pater [47].

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (1)$$

$$H = \frac{L}{N} \quad (2)$$

Podle van Deemtera vedou k růstu výškového ekvivalentu teoretického patra a tím k snížení účinnosti kolony tři děje:

- vířivá difúze A
- molekulární difúze B
- odpor proti přenosu hmoty C

Vířivá difúze souvisí s nehomogenitou stacionární fáze, kdy molekuly analytu při průchodu stacionární fází sice proudí stejnou rychlostí, ale urazí různou dráhu. Tím dochází k zvýšení výškového ekvivalentu teoretického patra vlivem rozmývání elučních zón. Molekulární difúze je způsobena difuzí látky v mobilní fázi z míst o vyšší koncentraci analytu do místa s nižší koncentrací. Následky tohoto děje jsou stejné jako u vířivé difúze.

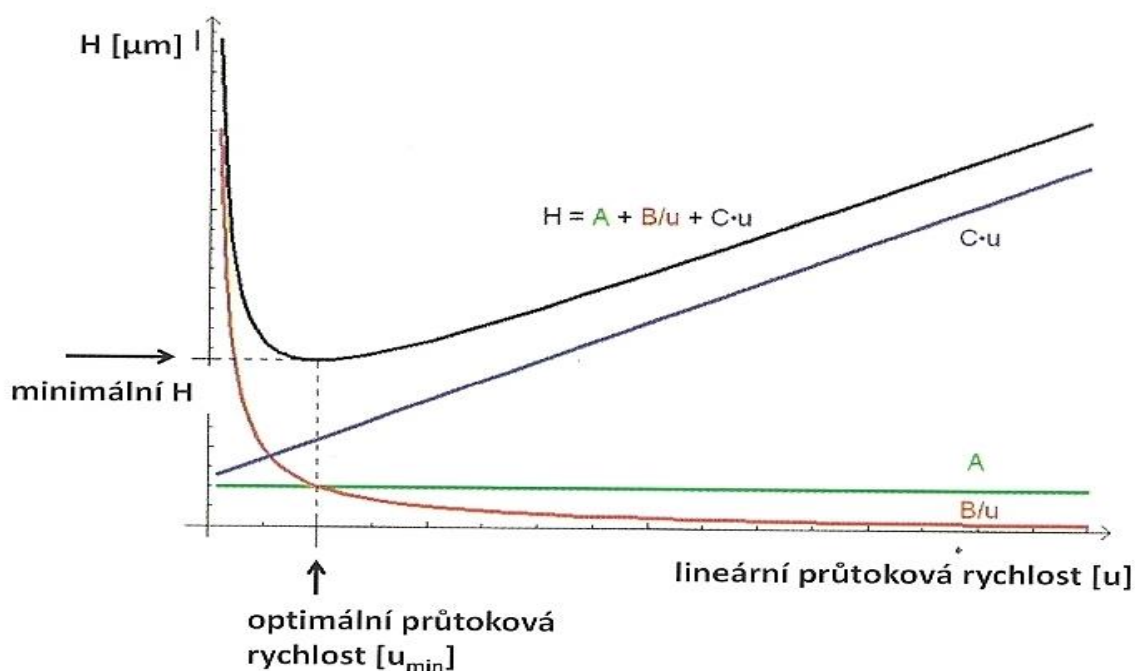
Pro kapalinovou chromatografii je nejdůležitější děj třetí, a to odpor proti přenosu hmoty. Tento děj je kombinací dvou dějů. Prvním je odpor přenosu hmoty ve stacionární fázi a je způsoben rozdílnou difúzí molekul analytu do stacionární fáze. Některé molekuly difundují hlouběji, jiné naopak méně. Molekuly, které difundují hlouběji jsou při zpětné difúzi do mobilní fáze vůči ostatním molekulám opožděny.

Druhým dějem je odpor přenosu hmoty v mobilní fázi, který je způsoben prouděním mobilní fáze kanálky ve stacionární fázi. Tok mobilní fáze se skládá z jednotlivých proudů o různé lineární rychlosti. Ve středu kanálky rychlost eluentu dosahuje maxima, ale u povrchu nosiče (stěny kapiláry) je rychlost mobilní fáze téměř nulová a tím je způsoben parabolický eluční profil. Vliv těchto dějů roste s rostoucí rychlostí mobilní fáze.

Vztah mezi lineární průtokovou rychlostí mobilní fáze u a výškou teoretického patra kolony H (účinností kolony), zahrnující výše jmenované děje, způsobující rozmývání elučních zón a tím snížení účinnosti separace, je popsán van Deemterovou rovnicí č. 3 [47, 49].

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (3)$$

Grafickým znázorněním této rovnice je pak van Deemterova křivka (obr. 5). Chromatografická kolona dosahuje své nejvyšší účinnosti při lineárním průtoku eluentu, které odpovídá minimu van Deemterovy křivky [48, 49].



Obr. 5.: Van Deemterova křivka se zobrazením optimální lineární průtokové rychlosti u_{\min} při minimu H a průběhu jednotlivých členů Deemterovy rovnice A , B , C [49].

2.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je instrumentální chromatografickou metodou založenou na principu klasické kapalinové chromatografie. Oproti klasické kapalinové chromatografii je HPLC částečně či úplně automatizována a pracuje za vyššího tlaku. K separaci dochází v HPLC kolonách, které jsou vyráběny pro různé aplikace v různých rozměrech. Obvyklé rozměry HPLC kolon jsou 2,1 - 4,6 mm v průměru a délce 30 - 250 mm. Kolony jsou naplněné sorbentem o velikosti částic nejčastěji 2 - 5 μm . Dnes se HPLC díky vysoké účinnosti separace stala jednou z nejpoužívanějších chromatografických metod. Je využívána k přečištění látek nebo k separaci látek ze směsi a k jejich následné identifikaci či kvantitativnímu stanovení ve vzorku [47].

2.5.2.1 Chromatografie s normální fází

Prvním vyvinutým uspořádáním kapalinové chromatografie byla chromatografie s normální fází (NP-HPLC, z angl. „Normal-phase HPLC“). V tomto uspořádání vyvinutém již na začátku 20. století se využívá polární stacionární fáze, nejčastěji na bázi oxidu křemičitého nebo oxidu hlinitého. Jako mobilní fáze se užívá rozpouštědlo o nižší polaritě než má samotná stacionární fáze (např. pentan, hexan). Někdy se přidává pro úpravu polarity mobilní fáze malý podíl polárního rozpouštědla (např. isopropanol, ethanol, methanol). Tato metoda našla uplatnění u látek rozkládajících se v jiných systémech obsahujících vodu v mobilní fázi nebo majících omezenou rozpustnost ve vodných roztocích (např. lipidy, vitamin K). Používá se také pro separace isomerů, které jsou v jiných systémech obtížně rozlišitelné (např. retinaly, retinoly) [47 - 49].

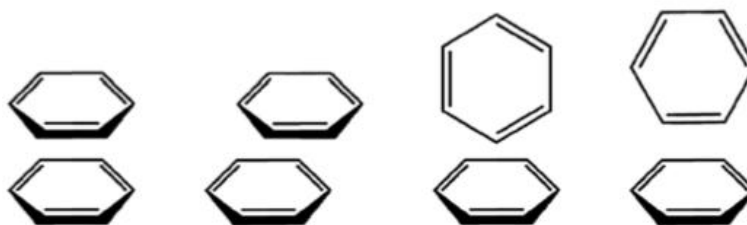
2.5.2.2 Chromatografie s reverzní fází

Na konci 70. let 20. století byla chromatografie s normální fází postupně nahrazována chromatografií s reverzními fázemi (RP-HPLC). V 21. století se už RP-HPLC stala dominantním uspořádáním a používá se téměř v 90 % chromatografických analýz. V RP-HPLC jsou využívány stacionární fáze nepolárního charakteru a mobilní fáze je naopak polárního charakteru. Stacionární nepolární fáze je tvořena chemicky modifikovaným nosičem nejčastěji na bázi silikagelu, někdy kopolymerů styrenu a divinylbenzenu aj. Na nošič jsou pak chemicky vazány uhlovodíkové řetězce nebo uhlovodíky (C4 - C18, fenyl, aj.) [47,49]. Vzhledem k nepolárnímu charakteru stacionární fáze se u reverzních fází prakticky nenacházejí aktivní centra pro polární interakce. Retence látek je tedy převážně způsobena slabými interakcemi analytu se stacionární fází jako je hydrofobní interakce nebo van der Waalsovy interakce [49]. RP-HPLC se proto využívá pro látky s vyšším obsahem hydrofobních oblastí, tedy méně polární. Výběrem různých typů stacionárních fází lze modifikovat druh interakcí na kterých je separace založena, a tím často i kvalitu samotné separace. Například při použití fází s uhlovodíkovými řetězci C8 – C18 dochází k separaci převážně na základě hydrofobních interakcí (obr. 6). Na druhé straně u fenylové stacionární fáze je separace zprostředkována hlavně π a π - π interakcemi (obr. 7) [50]. Jako mobilní fáze se ve většině případů používají směsi pufrů či vody s organickým rozpouštědlem (např. acetonitrilem, isopropanolem, methanolem).

K analýzám amatoxinů a falotoxinů je v literatuře popsáno využití převážně stacionárních fází C18 s použitím acetonitrilu nebo methanolu jako mobilní fáze [19, 38, 39, 51].



Obr. 6: Ukázka hydrofobní interakce stacionární fáze C8 [52]



Obr. 7: Ukázka možných π - π interakcí na benzenu [50]

2.6 Detekce v kapalinové chromatografii

Nejběžněji používanými detektory v HPLC jsou fotometrické, refraktometrické, fluorescenční a hmotnostní detektory. Pro dosažení nejvyšší citlivosti metody stanovení se pak používá dvojí detekce v podobě tandemového zapojení dvou detektorů. První z nich je zpravidla nedestruktivní a druhý naopak destruktivní [47, 48]. Příkladem může být tandemové zapojení detektoru pracujícího v oblasti vlnových délek viditelného a ultrafialového záření (UV/VIS) a hmotnostního spektrometru (MS, z angl. „Mass-spectrometry“).

V HPLC analýzách amatoxinů a falotoxinů bylo k jejich detekci již dříve využíváno detektoru diodového pole (DAD, z angl. „Diode array detector“) [30]. V poslední době se nejčastěji objevuje detekce pomocí DAD a tandemového zapojení MS s různými analyzátoři např. kvadrupolovým (Q, z angl. „Quadrupole“) [6, 16], iontovou pastí (IT, z angl. „Ion Trap“) [53] nebo průletovým analyzátořem (TOF, z angl. „Time Of Flight“) [28, 51, 33].

2.6.1 Detektor diodového pole

DAD detektor patří do skupiny fotometrických detektorů založených na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek UV/VIS záření. Detektor DAD umožňuje detekci látky při jakémkoliv zvolené vlnové délce nebo může snímat v reálném čase bez přerušení celé spektrum vlnových délek. Díky tomu je možné porovnávat měřená spektra s knihovnou spekter nebo předem naměřenými daty [49].

2.7 Detekce hmotnostní spektrometrií

MS je jednou z nejmodernějších a nejdokonalejších metod na poli analytické chemie umožňující kvantitativní i kvalitativní stanovení. Kromě toho lze použitím MS získat i informace o izotopickém složení jednotlivých prvků obsažených ve vzorku. Principem této metody je stanovení hmotnosti molekul a atomů po jejich převedení na ionty v iontovém zdroji přístroje. Produkované ionty jsou děleny na základě jejich efektivní hmotnosti m/z (kde m je hmotnost iontu a z nábojové číslo) [54].

K převedení molekul a atomů na ionty se v hmotnostní spektrometrii využívá různých druhů ionizačních technik např. elektronová ionizace (EI), ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace (CI), ionizace desorpcí laserem za spoluúčasti matrice (MALDI) aj. Většina ionizačních technik poskytuje možnost tvorby jak pozitivně, tak i negativně nabitých iontů vzorku a ionizaci lze uskutečnit jak za vakua (EI), tak za atmosferického tlaku (ESI) [55 – 57]. Vzniklé ionty jsou pak separovány v hmotnostním analyzátoru. Nejběžněji používané hmotnostní analyzátory jsou kvadrupolový, iontová past, iontová cyklotronová rezonance a průletový analyzátor.

Po separaci pak ionty dopadají na detektor, který detekcí elektrického proudu poskytuje signál úměrný počtu dopadajících iontů. Výsledkem je grafický záznam (tzv. hmotnostní spektrum), zobrazující hodnoty m/z jednotlivých iontů analyzovaného vzorku v závislosti na jejich procentuálním zastoupení [54, 56, 57].

2.7.1 Ionizace elektrosprejem

Tato technika ionizace je určena především k disperzi kapalin a aerosolů a je kombinována s různými druhy analyzátorů. Její užití je rozšířeno hlavně v on-line spojení HPLC (UPLC) s MS. Řadí se mezi měkké techniky ionizace. To znamená, že dochází k malé fragmentaci primárně vzniklého iontu v důsledku malého energetického přebytku dodaného molekule.

Ionizací elektrospojem dochází k produkci nabitých iontů $[M+zH]^{z+}$, $[M-zH]^{z-}$, kde M představuje molekulovou hmotnost a z náboj iontu [54, 55, 57].

2.7.2 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor patří mezi populární, snadno dostupné a nenáročné hmotnostní analyzátoary. Je schopen s jednotkovým rozlišením stanovit ionty v hmotnostním rozsahu m/z až 3000. Avšak proti jiným analyzátoarům disponuje menší rozlišovací schopností, která je jednotková [57].

Konstrukcí se jedná o čtyři stejné kovové tyče s kruhovým průřezem o délce 20 - 30 cm. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na další dvě záporné stejnosměrné napětí. Současně je na všechny tyče superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionty, vzniklé ionizací vzorku, jsou přivedeny do středu osy kvadrupólu, kde začnou oscilovat.

V daný časový okamžik jsou pak oscilace, při určitém poměru stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí (U/V), stabilní pouze pro ion o určité hodnotě m/z . Tento ion projde kvadrupólem a dostane se do detektoru, všechny ostatní ionty jsou zachyceny tyčemi kvadrupólu.

Při změně hodnot stejnosměrného napětí U a amplitudy V , přičemž jejich poměr zůstává konstantní, jsou pak postupně propouštěny na detektor všechny ionty. Svým principem slouží kvadrupólový analyzátor jako hmotnostní filtr [56, 57].

2.7.3 Trojitý kvadrupólový analyzátor

Trojitý kvadrupólový analyzátor (QqQ, TQ, z angl. „Triple Quadrupole“) [54] je tvořen třemi kvadrupóly řazenými za sebou. Princip tohoto analyzátoaru je následující. První kvadrupól slouží jako hmotnostní filtr a do druhého kvadrupólu jím projdou jen vybrané ionty.

Prostřední (druhý) kvadrupól slouží jako kolizní cela, kde zavedením kolizního plynu (způsobující kolizní excitaci) dochází k excitaci vybraných iontů a jejich následné fragmentaci. Vzniklé fragmenty jsou nakonec analyzovány v třetím kvadrupolovém analyzátoaru. Navíc může docházet k opakovaným srážkám prekurzorového i produktového iontu s molekulami kolizního plynu což vede k opakovaným kolizním excitacím. Díky tomu lze pozorovat více fragmentových iontů než u jiných MS/MS zapojení.

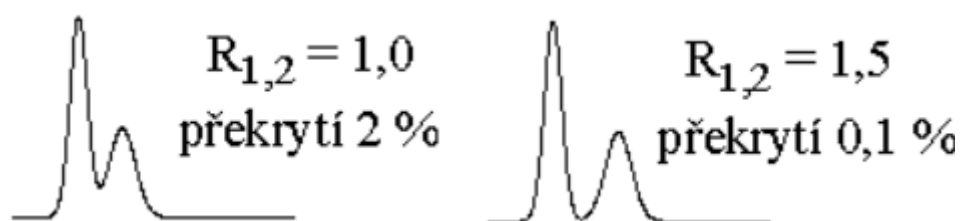
To přináší výhodu v možnosti měření různých typů skenů jako je sken produktových iontů, sken prekurzorových iontů, sken iontových reakcí nebo sken neutrálních ztrát [56].

2.8 Vyhodnocení výsledků HPLC analýz

K tomu, aby bylo možné výsledky analýzy správně vyhodnotit, je třeba dosáhnout co nejvyšší kvality separace. Pro posouzení kvality separace je v praxi využíván parametr rozlišení. Pro píky 1,2 bude příslušné rozlišení $R_{1,2}$ dáno rovnicí č. 4 [47 – 49],

$$R = 2 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_2 + w_1} \quad (4)$$

kde $t_{R,2}$ je retenční čas později eluujícího píku, $t_{R,1}$ je retenční čas dříve eluujícího píku, w_2 a w_1 jsou příslušné šířky píku při základnách. Ukázka vlivu kvality separace na hodnotu rozlišení je patrná z obrázku 8.



Obr. 8: Vliv kvality separace na hodnotu parametru rozlišení [52]

Pro správné vyhodnocení je také nutné, aby chromatografický systém rozlišoval různé analyty. Tato schopnost se nazývá selektivita α a je definována jako poměr retenčních faktorů dvou analytů, nebo poměr redukovaných retenčních časů (rovnice č. 5) [47 – 49].

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R,2}}{t'_{R,1}} \quad (5)$$

2.8.1 Kvalitativní hodnocení

V HPLC jsou pro identifikaci látek používány retenční časy nebo retenční objemy. Kromě retenčních časů (objemů) lze pro identifikaci látek využít specifických detektorů. Specifické detektory jako nukleární magnetická rezonance (NMR) nebo hmotnostní spektrometrie (MS)

poskytují detailní informace o sledované látce. Pomocí těchto detektorů lze získat údaje o struktuře látky (NMR) nebo molekulové hmotnosti, izotopickém složení atd., jak bylo popsáno v kap. 2.7 [49].

2.8.1.1 Retenční charakteristiky

Během separace pak může nebo nemusí docházet k interakcím se stacionární fází. Látka, která neinteraguje se stacionární fází a není na ní zadržována (chová se inertně) eluuje v retenčním čase t_M označován jako tzv. mrtvý retenční čas.

Pro každou separovanou látku je základní charakteristickou veličinou její retenční čas t_R . Retenční čas vyjadřuje dobu, kterou analyt stráví v koloně. Odečtením mrtvého retenčního času od retenčního času dané látky lze učit tzv. redukovaný retenční čas $t'_{R,i}$ (rovnice č. 6) a vyjadřuje dobu, kterou látka díky interakcím stráví ve stacionární fází [47, 49, 52, 57].

$$t'_{R,i} = t_{R,i} - t_M \quad (6)$$

Míra retence separovaných látek se však nejčastěji vyjadřuje pomocí retenčního faktoru k_i , který lze vyjádřit pomocí rovnice č. 7 [47 – 49].

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} = \frac{t'_{R,i}}{t_M} \quad (7)$$

2.8.2 Kvantitativní hodnocení

Po separaci složek obsažených ve vzorku v koloně jsou látky detegovány vhodným detektorem. Při průchodu látky celou detektorem je generován signál úměrný množství látky ve vzorku a tím je umožněna kvantitativní analýza. Kvantitativní vyhodnocení je tedy založeno na nalezení vztahu mezi množstvím eluované látky a plochou nebo výškou píku. Výšky píku pro kvantitativní vyhodnocení se však používají jen minimálně a pouze v případě symetrických úzkých píků. Stanovení metodami HPLC má vzhledem k měřeným veličinám relativní charakter a závislost mezi měřenou veličinou a koncentrací stanovovaného analytu musí být určena empiricky za pomoci standardů. Neznámá koncentrace je určena

komparativní metodou (porovnáním se standardem). Pro tento účel jsou používány klasické metody z instrumentální analýzy [29, 47]:

- Metoda vnějšího standardu
- Metoda vnitřního standardu
- Metoda přídavku standardu
- Metoda vnitřní normalizace

2.8.2.1 Metoda vnějšího standardu

Metoda známá též pod názvem metoda kalibrační přímky je nejjednodušším způsobem k určení neznámé koncentrace analytu ve vzorku. Metoda je založena na analýze série standardů o různé a známé koncentraci. Po nalezení závislosti kalibrační funkce $X = f(c)$ je neznámý obsah stanovované složky následně určen pomocí vyhodnocovací funkce $c = f(X)$, kde jako X je většinou brána plocha píku. Pro konstrukci kalibrační křivky je doporučeno použití alespoň 5 kalibračních standardů s několikanásobným opakováním měření (2 - 3 krát). Není podmínkou, aby kalibrační funkce byla lineární, ale vzhledem ke snaze zajistit nejspolehlivější výsledky je vhodnější pracovat s lineární funkcí. Po grafickém vynesení kalibračních bodů lze kalibrační křivku popsat rovnicí č. 8.

$$x_i = a + bc_i \quad (8)$$

kde x_i je hodnota měřené veličiny pro danou koncentraci c_i , b je směrnice přímky vyjadřující citlivost metody a a představuje posunutí (úsek) na ose y . V případě použití hodnoty plochy píku k vyhodnocení koncentrace přejde rovnice č. 8 ve tvar rovnice č. 9 [29, 47].

$$A_i = a + bc_i \quad (9)$$

2.8.2.2 Limit detekce a limit kvantifikace

Limit detekce (mez detekce, LOD, z angl. „Limit of Detection“) je definován jako nejnižší koncentrace látky, pro kterou lze statisticky odlišit analytický signál od šumu nebo driftu základní linie chromatogramu.

Koncentrace látky při které je možné přesné a správné kvantitativní vyhodnocení je pak označována jako limit kvantifikace (mez stanovitelnosti, LOQ, z angl. „Limit of Quantification“) [29, 47].

Limity LOD a LOQ lze vypočítat několika způsoby např. výpočtem ze směrodatné odchylky odezvy a směrnice kalibrační přímky nebo výpočtem s využitím poměru signálu a šumu. Při výpočtu využívající šumu je nezbytné používat stejné jednotky pro směrnici b i hodnotu šumu (výška píku). K výpočtu LOD a LOQ je užíváno rovnic 10 a 11 [29].

$$LOD = \frac{3 \cdot \text{šum}}{b} \quad (10)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \text{šum}}{b} \quad (11)$$

3. Experimentální část

3.1 Chemikálie

K přípravě extrakčních činidel pro přímou extrakci byl použit: methanol (99,99%, Sigma-Aldrich, Německo), kyselina chlorovodíková (35% p.a., Lach-Ner, ČR), kyselina mravenčí (98 - 100% p.a., Riedel-de Haën, Německo) a deionizovaná voda. K přípravě mobilních fází pro HPLC analýzy byl použit: acetonitril (99,99%, Fluka Analytical, Německo), methanol (99,99% HPLC grade, Sigma-Aldrich, Německo), kyselina mravenčí (98 - 100% p.a., Riedel-de Haën, Německo), octan amonný (p.a., Penta, ČR) a deionizovaná voda.

Pro přípravu reálných vzorků byly použity kloubouky z plodnic muchomůrky zelené nasbírané v lokalitě Praha – Chuchle, dodané Mgr. Janem Borovičkou, Ph.D. z ÚJF AV ČR, v.v.i..

Na přípravu roztoků standardů vybraných toxinů byly použity: α -amanitin (research grade, Serva Feinbiochemica Heidelberg, Německo), β -amanitin (~ 90% (HPLC), Sigma-Aldrich, Německo), falacidin (\geq 85%, Sigma-Aldrich, Německo), faloidin (\geq 90%, Sigma-Aldrich, Německo).

3.2 Instrumentace

Pro filtraci po přímé extrakci byly použity stříkačkové mikrofiltry Corning (0,45 μ m, Corning Incorporated, Německo).

K centrifugaci vzorků byla použita centrifuga Allegra X-22R (Beckman Coulter, USA).

Hodnota pH mobilních fází byla změřena pomocí pH metru Jenway 3510 pH Meter (Bibby Scientific Limited, Velká Británie)

K HPLC–DAD analýzám byl využíván vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent serie 1260 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) složený z vysokotlaké pumpy (Agilent Technologies 1260 Infinity), termostatovaného automatického dávkovače (Agilent Technologies 1260 Infinity), kolonového termostatu (Agilent Technologies 1200 Series) a detektoru diodového pole (Agilent Technologies 1200 Series). Data byla vyhodnocena v programu Agilent OpenLab CDS ChemStation (Agilent Technologies).

K HPLC–DAD–MS/MS analýzám byl využíván vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent Serie 1290 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) složený z vysokotlaké pumpy (Agilent Technologies 1290 Infinity), termostatovaného automatického dávkovače

(Agilent Technologies 1290 infinity), kolonového termostatu (Agilent Technologies 1290 Series), detektoru diodového pole (Agilent Technologies 1290 Series) a tandemově zapojeného trojitého kvadrupólového hmotnostního spektrometru (Agilent 6460) s ESI ionizací (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Data byla vyhodnocena v programu Agilent MassHunter (Agilent Technologies).

Všechny analýzy byly provedeny na koloně Zorbax SB – Phenyl (250 × 4,6 mm, 5 μm, Agilent Technologies, USA).

3.3 Extrakce toxinů muchomůrky zelené

Pro extrakci toxinů byly vybrány dva klobouky muchomůrky zelené a optimalizace byla rozdělena na dvě části. V první části byly dvoukrokovou extrakcí připraveny hrubé extrakty, které byly použity pro vývoj a optimalizaci metody stanovení pomocí HPLC-DAD. Po vyvinutí vhodné metody stanovení byly vybrané toxiny v extraktech kvantifikovány a dle výsledků byla vybrána dvě extrakční činidla s nejvyšší výtěžností extrakce pro další podrobnější experimenty.

V druhé části bylo pak stejným způsobem jako v první části optimalizace vybráno optimální extrakční rozpouštědlo a u něj sledována kinetika extrakce vybraných toxinů.

3.3.1 Pilotní extrakce

K pilotní extrakci byl vybrán zmrazený klobouk mladší, plně vzrostlé plodnice (sklenutý okraj klobouku). Extrakce byla provedena dvoukrokově se čtyřmi extrakčními činidly: a) methanol (100%), b) 0,1% methanolický roztok kyseliny mravenčí, c) směs methanol:voda v poměru 1:1 (v/v) a d) směs methanol:voda:kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,01 mol/l v poměru 5:4:1 (v/v/v).

3.3.1.1 První krok extrakce

Zmrazený klobouk o hmotnosti 23,82 g byl rozkrájen na malé, stejně velké kousky a byl rozvážen na čtyři díly o stejné hmotnosti 5,95 g do 100 ml extrakčních nádob. Při tomto procesu došlo k částečnému rozmrazení, při kterém byly získány 4 ml vody s možným obsahem vylouhovaných toxinů. Ve snaze zachovat stejné podmínky pro všechny díly bylo proto ke každému podílu přidáno po 1 ml tohoto výluhu a v zápětí bylo ke každému podílu přidáno 9 ml příslušného extrakčního činidla. Extrakční nádoby pak byly uzavřeny pomocí

parafilmu dány třepat na rotační třepačku (240 RPM, 18 hodin, laboratorní teplota - RT). Po ukončení třepání byly fáze dobře oddělené. Proto byly vodné složky extraktu odebrány injekční stříkačkou a přefitrovány přes stříkačkové mikrofiltry. Tímto byl získán extrakt v prvním kroku.

3.3.1.2 Druhý krok extrakce

Po odebrání veškerého extračního činidla přidaného v prvním kroku, byl přidán stejný alikvot extrakčního činidla jako v prvním kroku a celý postup se opakoval. Takto byl získán extrakt v druhém kroku.

Získané extrakty v jednodlitých krocích nebyly spojeny a byly uchovávány v temnu a chladu při 4 °C.

3.3.2 Extrakce za částečně optimalizovaných podmínek

Pro podrobnější testování extrakce a pozdějšímu stanovení toxinů byl vybrán zmrazený klobouk staré plodnice (plochý masivní klobouk). Extrakce byla provedena opět dvoustupňově s extrakčními činidly, která byla vybrána jako vhodná při pilotních extrakcích, a to s 0,1% methanolickým roztokem kyseliny mravenčí a směsí methanol:voda: kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,01 mol/l v poměru 5:4:1 (v/v/v).

3.3.2.1 První krok extrakce a kinetika extrakce

Zmrazený klobouk o hmotnosti 58,42 g byl rozkrájen na malé kousky a rozetřen v třecí misce. Po pečlivé homogenizaci byly do 100 ml kádinek naváženy navážky 15,65 g a 17,22 g. K navážkám bylo přidáno extrakční rozpouštědlo v poměru 2 ml extrakčního činidla na 1 g navážky. K navážce 15,65 g bylo přidáno 31,3 ml extrakční směsi methanol:voda: kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,01 mol/l v poměru 5:4:1 (v/v/v). Navážka 17,22 g pak byla extrahována 34,4 ml 0,1% methanolickeho roztoku kyseliny mravenčí.

V průběhu druhé extrakce byla také sledována kinetika extrakce toxinů postupným odebíráním malého objemu extračního činidla, a to již od doby přidání extrakčního činidla. Ihned po přidání bylo odebráno 200 µl extračního činidla (čas t_0). Následně byly nádoby uzavřeny, dány třepat za laboratorní teploty na rotační třepačku při 240 otáčkách za minutu. Odběry pak probíhaly každou hodinu po dobu 5 hodin (čas t_5). Po posledním odběru byly extrakční nádoby uzavřeny a ponechány třepat na celkovou dobu 18 hodin.

Po ukončení třepání byl celý objem centrifugován (4500g, 5 min, RT). Následně byly extrakty odebrány injekční stříkačkou a přefiltrovány přes stříkačkové mikrofiltry.

3.3.2.2 Druhý krok extrakce za částečně optimalizovaných podmínek

Po odebrání veškerého extračního činidla byl přidán objem 15 ml extrakčního činidla a extrakční nádoby byly za stejných podmínek znovu dány třepat po dobu 4 hodin. Po ukončení třepání byl následující postup stejný jako v prvním kroku. Získané extrakty v obou krocích také nebyly spojeny a byly uchovávány v temnu a chladu při 4 °C.

3.4 Příprava vzorků pro HPLC analýzy

3.4.1 Příprava standardů a kalibračních roztoků

Byly připraveny methanolicke roztoky β -amanitinu, falacidinu a faloidinu o koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$. Standard α -amanitinu byl již dodán jako methanolicke roztok o stejné koncentraci.

Pomocí těchto roztoků byl připraven směsný standard všech 4 analytů o společné koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Dále byly ředěním připraveny dvě série kalibračních roztoků, z nichž každá série obsahovala dvojici toxinů. Takto byla připravena kalibrační série pro α - a β - amanitin s kalibračními body o koncentracích 1, 10, 25, 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ sledovaných látek. Druhá série pro dvojici falacidin a faloidin pak byla připravena stejným způsobem.

3.4.2 Příprava reálných vzorků pro analýzy

K analýzám byly extrakty získané v prvním kroku pilotní extrakce ředěny 5 krát mobilní fází o složení: 1 mM vodný roztok octanu amonného s 0,1% obsahem kyseliny mravenčí a methanol v poměru 50:50 (v/v). Extrakty získané v druhém kroku extrakčními činidly směs methanol:voda: kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,01 mol/l v poměru 5:4:1 (v/v/v) a směs methanol:voda v poměru 1:1 (v/v) byly ředěny touto mobilní fází dvakrát. Extrakty z druhého kroku extrakce 0,1% methanolicke roztokem kyseliny mravenčí a methanolem byly ředěny třikrát.

Extrakty získané za částečně optimalizovaných podmínek (viz kap. 9.2) tj. 0,1% methanolicke roztokem kyseliny mravenčí a směsí methanol:voda: kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,01 mol/l v poměru 5:4:1 (v/v/v) získané v prvním kroku extrakce byly ředěny 5 krát mobilní fází. K ředění bylo využito mobilní fáze o složkách 1mmol/l vodný roztok

octanu amonného okyseleným kyselinou mravenčí na pH 3,33 (složka A) a methanol (složka B), odpovídající počátečnímu složení při gradientové eluci tj. 70A:30B (v/v) (viz kap. 4.1.3). Tato mobilní fáze byla použita i pro ředění extraktu získaného v druhém kroku směsí methanol:voda:kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,01 mol/l v poměru 5:4:1 (v/v/v). K ředění extraktu získaného v druhém kroku extrakce 0,1% methanolickým roztokem kyseliny mravenčí byl použit 100% methanol (viz kap. 4.3). Extrakty z druhých kroků extrakcí byly ředěny vždy dvakrát.

Odebrané alikvoty 200 μ l, určené ke sledování kinetiky extrakce byly pro analýzy ředěny dvakrát mobilní fází o složení odpovídajícímu počátečnímu složení gradientu.

Po naředění byly všechny vzniklé roztoky, kromě vzorků ředěných methanolem, přefiltrovány přes stříkačkové mikrofiltry. Důvody ředění methanolem a nikoliv mobilní fází budou diskutovány (viz kap. 4.3).

3.5 Kvalitativní hodnocení

Kvalitativní hodnocení analýz bylo prováděno porovnáváním retenčních časů píků separovaných látek v extraktu s retenčními časy standardů α -, β -amanitinu, falacidinu a faloidinu. Dále byl pro kontrolu správnosti identifikace analytů ke 100 μ l vzorku 5krát ředěného extraktu přidáváno 50 μ l směšného standardu všech 4 analytů o společné koncentraci 50 μ g/ml.

Později byla identita vybraných toxinů potvrzena i hmotnostní spektrometrií.

3.6 Kvantitativní hodnocení

Pro kvantitativní hodnocení byly připraveny dvě série kalibračních roztoků sledovaných toxinů obsahující vždy dvojici ze stanovovaných látek. Takto byla připravena série kalibračních roztoků obsahující α -, β -amanitin o společné koncentraci obou látek 1, 10, 25, 50 a 100 μ g/ml. Stejným způsobem pak byla připravena i série kalibračních roztoků pro dvojici látek falacidin a faloidin. Koncentrace α -, β -amanitinu, falacidinu a faloidinu v extraktech byly vypočteny pomocí rovnic naměřených kalibračních závislostí ploch píku na koncentraci. Pro vyjádření koncentrace toxinů v reálném vzorku připraveného druhou extrakcí byly zjištěné koncentrace vztaženy na gram navážky vzorku.

Limity LOD a LOQ byly vypočteny využitím směrnice kalibračních závislostí výšek píku na koncentraci a hodnoty šumu základní linie chromatogramu.

4. Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace HPLC separace

Pro hledání optimálních podmínek pro separaci studovaných analytů byla použita kolona Zorbax SB-Phenyl (250 × 4,6 mm, 5 μm). Proces optimalizace zahrnoval výběr vhodného organického modifikátoru mobilní fáze, testování isokratické a později gradientové eluce. Během optimalizace byl sledován vliv hodnoty pH octanu amonného – vodné složky mobilní fáze (isokratická eluce), rychlosti průtoku mobilní fáze a teploty (obojí gradientová eluce) na separaci sledovaných látek. Během celého průběhu optimalizace byla identita látek určována porovnáváním se standardy sledovaných toxinů a tzv. spikováním reálných vzorků pomocí směsného standardu všech 4 studovaných analytů.

4.1.1 Výběr organického modifikátoru mobilní fáze

Základní informace pro volbu mobilní fáze byly převzaty z odborné literatury. Ve většině případů byl jako vodná složka mobilní fáze použit vodný roztok octanu amonného o koncentraci v řádu jednotek až desítek mmol/l. Tento roztok byl pak okyselen slabými těkavými organickými kyselinami jako je kyselina octová, mravenčí nebo tetrafluoroctová. Jako organický modifikátor byl volen nejčastěji acetonitril, ale byl použit i methanol. Toxiny pak byly s použitím UV/VIS detektoru detegovány při vlnové délce 295 nebo 302 nm [4, 9, 32, 51].

V první části optimalizace bylo tedy nutné určit vhodný organický modifikátor mobilní fáze a složení mobilní fáze. Vzhledem k plánovanému budoucímu použití hmotnostní detekce není vhodné používat vysoké koncentrace solí v mobilní fázi z důvodu možnosti zanesení kapilárního systému hmotnostního spektrometru.

Pro testování vhodného složení mobilní fáze byla připravena mobilní fáze o složkách 1 mmol/l vodný roztok octanu amonného s 0,1% obsahem kyseliny mravenčí o pH 2,72 (složka A) a jako organický modifikátor zvolen acetonitril (složka B). Pro hodnocení separace byly vybrány standardy analytů u kterých byla predikována nejmenší a největší retence. Jako analyt s největší retencí byl vybrán faloidin a s nejmenší α-amanitin. V této mobilní fázi byly pomocí standardů proměřeny retenční časy obou analytů za podmínek isokratické eluce při složení mobilní fáze 10 – 90 % vodné složky A. Dávkovaný objem vzorku byl 5 μl a průtok mobilní fáze 0,7 ml/min, termostatování kolony bylo nastaveno na 30 °C a bylo využito

UV/VIS detekce při 295 nm. Měření bylo pak následně opakováno za použití methanolu jako organického modifikátoru.

Meřením bylo zjištěno, že při použití acetonitrilu dochází k poměrně rychlé eluci analytů i za vysokého obsahu vodné složky v mobilní fázi. Významného rozdílu v retenci obou analytů bylo dosaženo až při 80 obj. % vodné složky v mobilní fázi, zatímco u methanolu bylo pro srovnatelnou separaci potřeba pouhých 50 obj. % (viz tabulky 1 a 2).

Tabulka 1. Retenční časy α -amanitinu a faloidinu při isokratické eluci s použitím acetonitrilu.

Složení mobilní fáze (A:B)	α -amanitin t_R (min)	faloidin t_R (min)
60:40	3,67	4,56
70:30	4,69	5,32
80:20	6,63	11,93

* A-1mM vodný roztok octanu amonného s 0,1% obsahem kyseliny mravenčí, pH = 2,72, B-acetonitril

Tabulka 2. Retenční časy α -amanitinu a faloidinu při isokratické eluci s použitím methanolu.

Složení mobilní fáze (A:B)	α -amanitin t_R (min)	faloidin t_R (min)
40:60	4,88	6,47
50:50	5,83	9,87
60:40	8,23	21,63

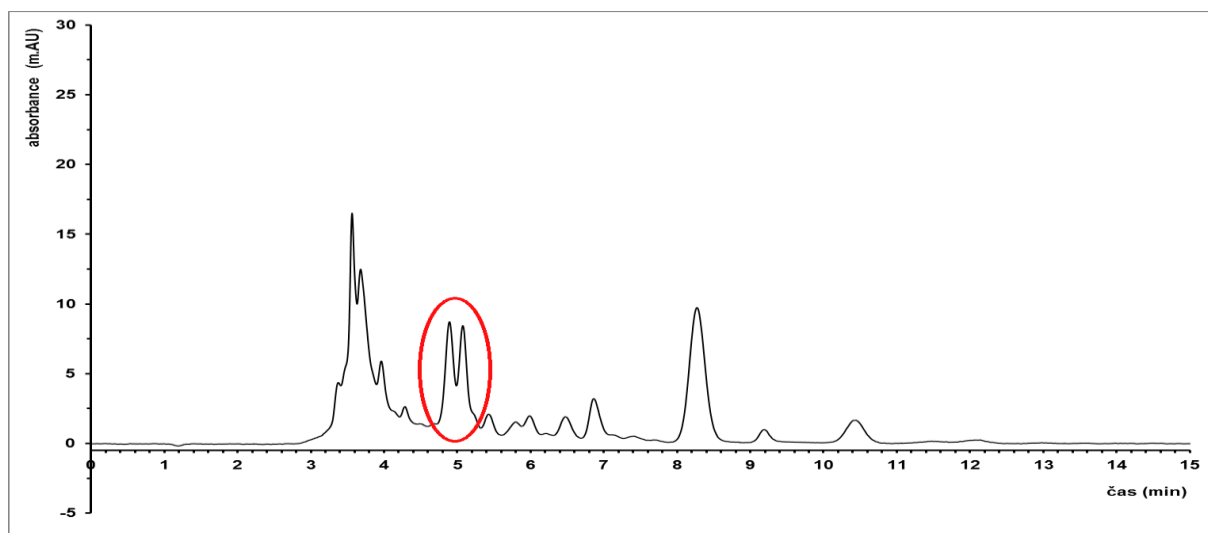
* A-1mM vodný roztok octanu amonného s 0,1% obsahem kyseliny mravenčí, pH = 2,72, B-methanol

Jako organický modifikátor pro budoucí analýzu reálných vzorků byl zvolen methanol, který poskytuje větší diferenci v retenčních časech pro standardy a měl by být tedy vhodnější pro separaci složitější směsi.

Jako nejvhodnější se ukázalo složení mobilní fáze o složkách 1mmol/l vodný roztok octanu amonného s 0,1% obsahem kyseliny mravenčí o pH 2,72 a methanol v poměru 50:50. Při tomto složení mobilní fáze byl za podmínek isokratické eluce proměřen 5 krát zředěný

extrakt získaný v prvním kroku pilotní extrakce 0,1% methanolickým roztokem kyseliny mravenčí.

Jak ukazuje chromatogram (obr 9), došlo k dobré separaci několika látek, řada dalších však vykazovala větší či menší stupeň koeluce. Zakroužkované oblasti odpovídají β - a α -amanitinu, které jsou klíčovými analyty. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k další úpravě složek mobilní fáze, a to k testování vlivu pH vodné složky mobilní fáze na separaci.



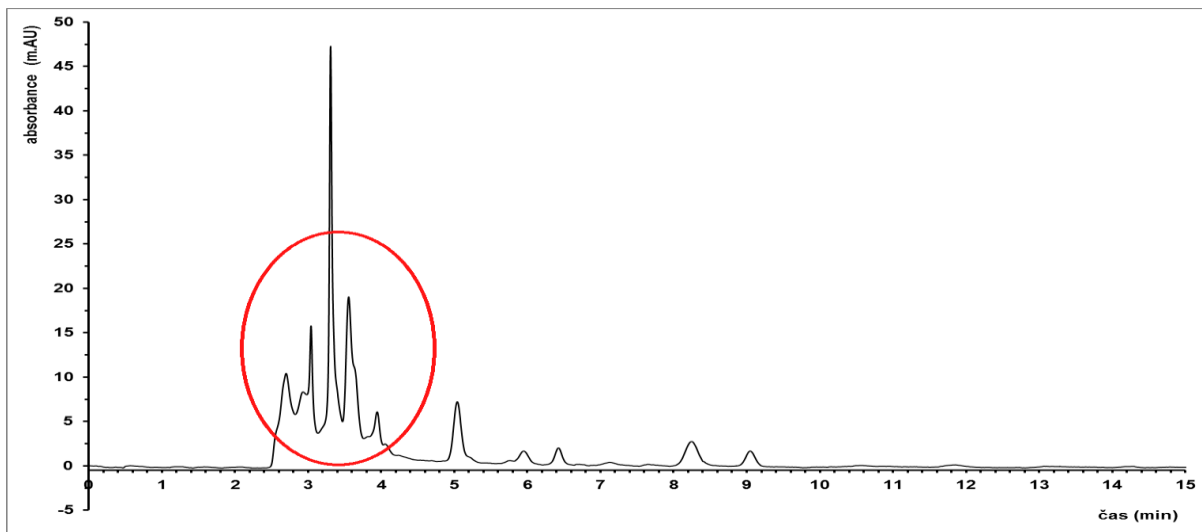
Obr. 9: Chromatogram extraktu muchomůrky zelené při pH vodné složky mobilní fáze 2,72

4.1.2 Optimalizace pH vodné složky mobilní fáze

K optimalizační studii pH vodné složky o složení mobilní fáze 1mmol/l vodný roztok octanu amonného s 0,1% obsahem kyseliny mravenčí o pH 2,72 (složka A) a methanol (složka B) v poměru 50:50 byl využit znovu 5 krát zředěný extrakt získaný v prvním kroku pilotní extrakce pomocí 0,1 % methanolického roztoku kyseliny mravenčí. S extraktem byly provedeny analýzy při různých hodnotách pH. Za tímto účelem byla připravena série modifikací vodné složky mobilní fáze A obsahující vždy octan amonný o koncentraci 1 mmol/l a různých hodnotách pH. Hodnota pH 2,72 původní vodné složky A byla brána jako nejnižší sledovaná hodnota. Jako maximální pak byla vybrána hodnota pH samotného 1mM vodného roztoku octanu amonného bez přídavku kyseliny mravenčí, a to pH 6,79.

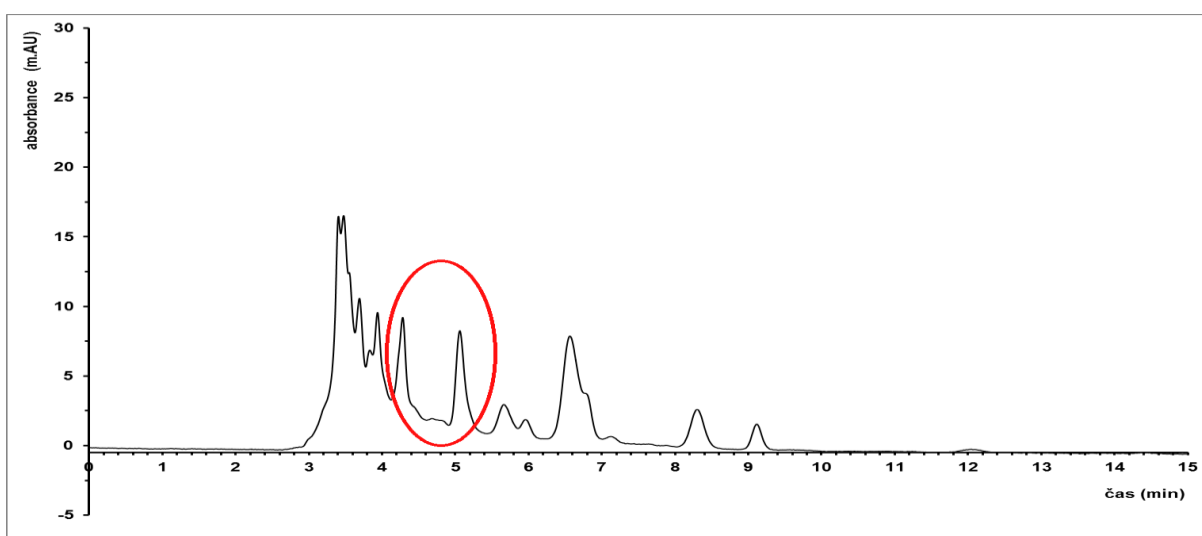
Použití neokyseleného octanu amonného jako vodné složky mobilní fáze se však ukázalo nevhodné, protože došlo k podstatnému zrychlení eluce α - a β -amanitinu, jak je vidět ze

zakroužkované oblasti na chromatogramu (obr. 10). K dosažení lepší separace bylo nutné se vrátit do kyselější oblasti.

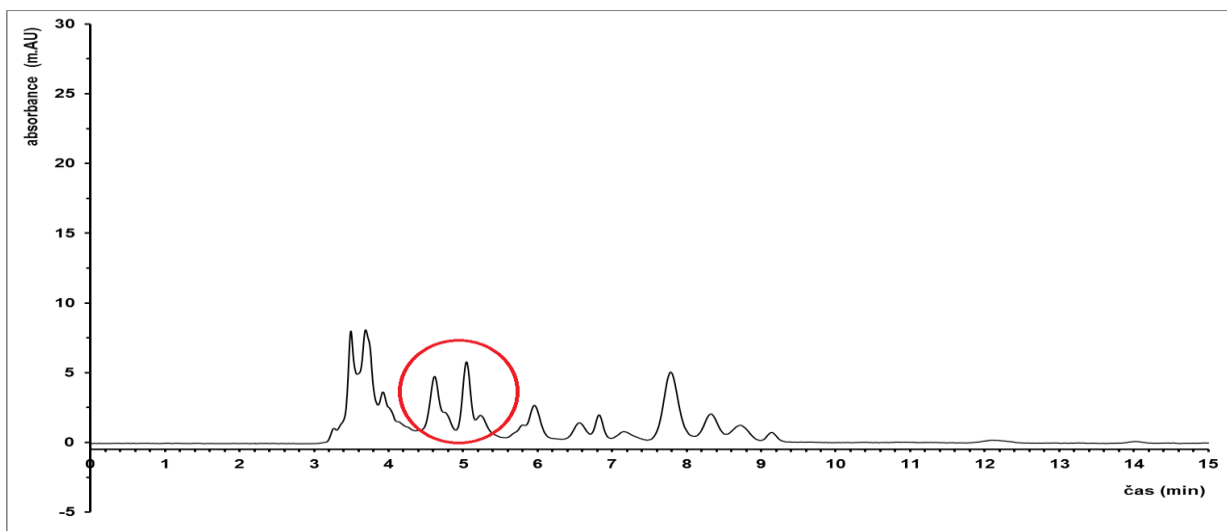


Obr. 10: Chromatogram extraktu muchomůrky zelené při pH vodné složky mobilní fáze 6,79.

Na základě toho bylo pH 1mmol/l vodného roztoku octanu amonného upraveno kyselinou mravenčí tak, aby se od původní hodnoty 2,72 zvyšovalo postupně o 0,5. Takto byly připraveny mobilní fáze s roztoky 1mM vodného roztoku octanu amonného o pH 3,22 a 3,77. Z chromatogramů (obr. 11 a 12) je patrné výrazné zlepšení separace klíčového páru analytů způsobené změnou pH. Mírným poklesem hodnoty pH z 3,77 na 3,22 docházelo k prodloužení retence obou analytů a vydělování dalších minoritních píků.



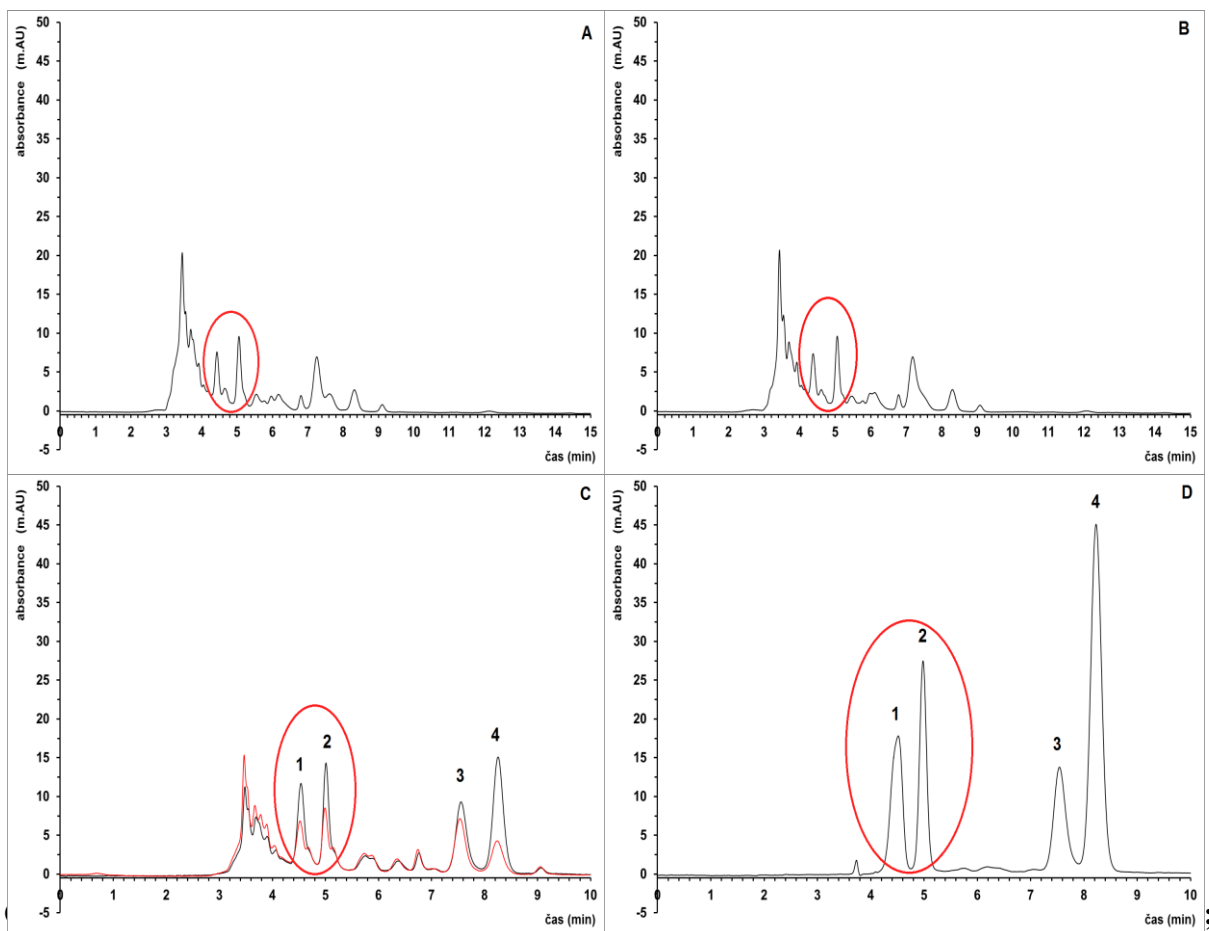
Obr. 11: Chromatogram extraktu muchomůrky zelené při pH vodné složky 3,77.



Obr. 12: Chromatogram extraktu muchomůrky zelené při pH vodné složky 3,22.

Bylo zřejmé, že adjustací hodnot pH 1mmol/l vodného roztoku octanu amonného lze dobře ovlivňovat separaci obou analytů. Vzhledem k tomu, že změna pH o půl jednotky (resp. o jednotku) vedla k velkému rozdílu v separaci látek, byly dále testovány malé změny pH, a to hodnoty 3,33; 3,41 a 3,55. Během tohoto měření se rovněž prokázala velká závislost separace sledovaných látek, zejména β -amanitinu, který má ve své struktuře karboxylovou skupinu, na hodnotě pH 1mmol/l vodného roztoku octanu amonného. Ze získaných výsledků bylo jako optimální pH vodné složky mobilní fáze zvoleno pH 3,33, při kterém bylo dosaženo nejlepší separace (obr. 13A-D). Při tomto pH byl pro identifikaci analytů v extraktu proměřen směsný standard všech 4 analytů o společné koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ (obr. 13D), extrakt a extrakt spikovaný směsným standardem (obr.13C). Černá čára na obr. 13C patří spikovanému vzorku (přídavek směsného standardu α -, β -amanitinu, falacidinu a faloidinu o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$), červená pak nespikovanému extraktu. V extraktu byly identifikovány všechny čtyři sledované toxiny. Píky analytů byly číslovány a identita látek byla určena následovně: 1. β -amanitin, 2. α -manitin, 3. falacidin, 4. faloidin. Chromatogram 13D demonstruje separaci všech čtyř standardů pro porovnání.

Nicméně jak dokládá obrázek 13C, použitím isokratické eluce nebylo dosaženo úplné separace všech sledovaných toxinů, a proto bylo přistoupeno k použití a optimalizaci gradientové eluce.



C – pH 3,33, červená čára- nespikovaný extrakt, černá čára– spikovaný extrakt; D – směsný standard toxinů (1. β -amanitin, 2. α -amanitin, 3. falacidin, 4. faloidin).

4.1.3 Optimalizace gradientové eluce

S cílem dosáhnout lepšího rozdělení klíčového páru α - a β -amanitinu bylo přistoupeno k optimalizaci programu gradientové eluce. Kromě toho byla snaha o rozdělení minoritních píků a lepší oddělení dvojice amanitinů od shluku píků na počátku chromatogramu. K optimalizaci byl využit opět 5 krát zředěný extrakt získaný v prvním kroku pilotní extrakce pomocí 0,1 % methanolického roztoku kyseliny mravenčí. Průtok mobilní fáze byl 0,7 ml/min, teplota na koloně byla 30 °C a bylo dávkováno 5 μ l vzorku.

Pro oddělení klíčového páru od shluku na začátku chromatogramu bylo třeba oproti isokratické eluci snížit eluční sílu mobilní fáze na začátku analýzy. Toho při použití 1mmol/l vodného roztoku octanu amonného s 0,1% obsahem kyseliny mravenčí o pH 3,33

a methanolu, jako složek mobilní fáze, bylo dosaženo vyšším podílem vodné složky než je 50 obj. %.

Počáteční složení mobilní fáze bylo 1mmol/l vodný roztok octanu amonného okyselený kyselinou mravenčí na pH 3,33 (složka A) a methanol (složka B) v poměru 60:40. Dále vzhledem k poměrně dobré separaci dosažené isokratickou elucí, bylo složení mobilní fáze v průběhu gradientového programu koncipováno tak, aby se příliš nelišilo od složení při isokratické eluci. Pro zrychlení analýzy a eluce látek, které by mohly být silně zadržovány na koloně a odstranění možných nečistot ze vzorku z chromatografického systému, byla ke konci analýzy zvýšena eluční síla mobilní fáze rychlým gradientem až do 100 obj. % methanolu v mobilní fázi. Následovala ekvilibrace na počáteční podmínky a po každé analýze byla kolona ekvilibrována 10 minut. Původně navrhnutý gradientový program je vyznačen v tabulce 3.

Tabulka 3. Prvotní lineární gradientové eluce použitá při HPLC-DAD analýzách.

čas (min)	A (%)	B (%)
0	60	40
2	50	50
8	50	50
10	30	70
12	30	70
15	0	100
18	60	40

* A-1mM vodný roztok octanu amonného okyselený kyselinou mravenčí na pH = 3,33, B-methanol

Jak se během analýz ukázalo, počáteční složení 60:40, A:B, vedlo k malému prodloužení doby analýzy. Nevedlo však k většímu oddělení klíčového páru od shluku píků, ale ani k jejich lepší separaci. Kromě toho se ukázalo, že není důvod ponechávat stoupaní gradientu až do 100% methanolu protože všechny píky obsažené v chromatogramu eluovaly dříve než obsah methanolu v mobilní fázi dosáhl 100 obj. %. Z tohoto důvodu byl nakonec tento krok gradientu v dalších analýzách vynechán.

Obsah vodné složky na počátku gradientu byl pro větší snížení eluční síly ještě zvýšen, a to na 70 obj. %. Analýzami při tomto počátečním složení mobilní fáze bylo dosaženo nejen významného oddělení dvojice amatoxinů od shluku píků, ale i významné změny v separaci

jak sledovaných analytů, tak minoritních píků. Po drobných úpravách byl následně získán optimální program gradientové eluce, který je uveden v tabulce č. 4 po kterém následovala ekvilibrace kolony po dobu 10 minut.

Tabulka 4. Optimalizovaný program lineární gradientová eluce použitý při HPLC-DAD-(MS/MS) analýzách.

čas (min)	A (%)	B (%)
0	70	30
3	55	45
8	55	45
13	40	60
14	40	60
15	70	30

* A-1mM vodný roztok octanu amonného okyselený kyselinou mravenčí na pH = 3,33, B-methanol

4.1.4 Testování termodynamiky a kinetiky separace

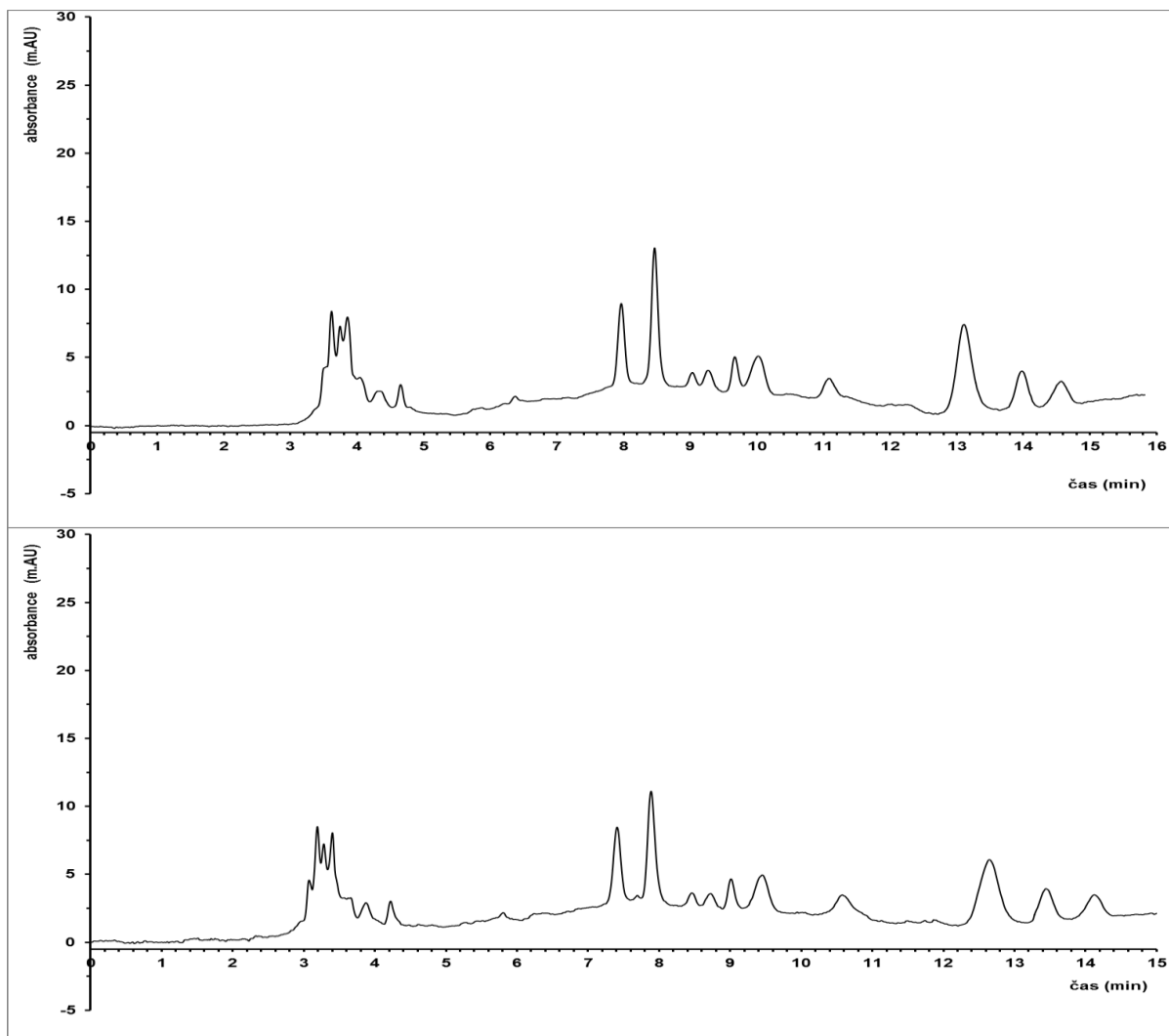
Po nalezení vhodného gradientového programu, při kterém docházelo k nejlepší separaci sledovaných analytů, především α - a β -amanitinu, byl sledován vliv změny kinetiky (průtokové rychlosti mobilní fáze) a termodynamiky (vlivu teploty) na separaci. Testování bylo realizováno s 5krát ředěným extraktem muchomůrky zelené získaného 0,1 % methanolickým roztokem kyseliny mravenčí s použitím vyvinutého programu gradientové eluce (viz tabulka 3).

Zvyšováním teploty o 5 °C z původních 20 °C v intervalu teplot 20 – 35 °C byla nejdříve sledována termodynamika separace. Analýzy pro sledování vlivu teploty na separaci byly provedeny při teplotách 20, 25, 30 a 35 °C.

Vliv průtokové rychlosti na separaci byl sledován v intervalu průtokové rychlosti 0,5 – 0,9 ml/min, zvyšováním průtoku po 0,1 ml/min z průtokové rychlosti 0,5 ml/min. Po každé změně byla provedena analýza a byl sledován vliv této změny na separaci látek. Průběh analýz byl obdobný jako při sledování termodynamiky pro průtokové rychlosti 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 a 0,9 ml/min.

Testováním bylo zjištěno, že ani změna průtokové rychlosti, ani změna teploty zásadně neovlivňuje separaci analytů. Zvýšením nebo snížením těchto parametrů však dochází ke

zkrácení (zvýšením) respektive prodloužení (snížením) retenčních časů sledovaných látek, jak je vidět z porovnání obrázků 14 a 15.

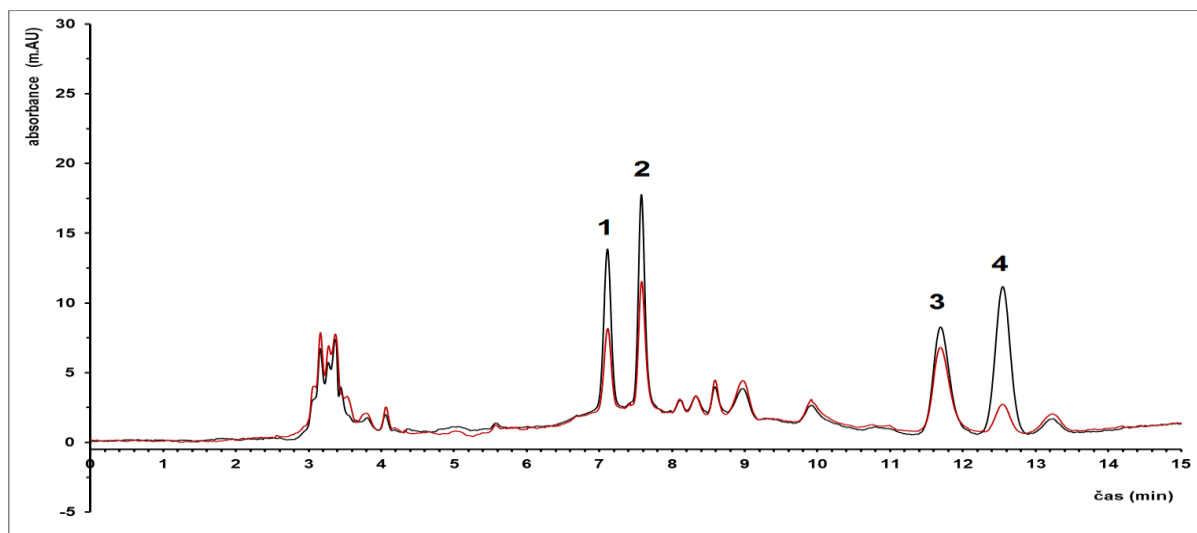


Obr. 14: Ukázka chromatogramů extraktu muchomůrky zelené během testování kinetiky a termodynamiky: nahoře – průtok mobilní fáze 0,7 ml/min, teplota 35 °C; dole – průtok mobilní fáze 0,8 ml/min, teplota 30 °C

Jako optimální podmínky pro analýzu toxinů metodou HPLC-DAD byly zvoleny: lineární gradientová eluce (tabulka 4) za použití mobilních fází (A) 1mM vodného roztoku octanu amonného okyseleného kyselinou mravenčí na pH 3,33 a (B) 100% methanolu, teplota na koloně 35 °C a rychlost průtoku mobilní fáze 0,8 ml/min. Teplota vzorků byla 25 °C, dávkovaný objem vzorku byl 5 μ l a data byla měřena v UV oblasti při vlnové délce 295 nm.

Za těchto optimalizovaných podmínek byl na závěr proměřen extrakt muchomůrky zelené získaný 0,1% methanolickým roztokem kyseliny mravenčí.

Měřením za optimalizovaných podmínek bylo dosaženo dalšího zrychlení eluce studovaných látek, bez negativního vlivu na separaci jak klíčových analytů, tak minoritních píků (obr.15).



Obr. 15: Chromatogram hrubého extraktu muchomůrky zelené získaného 0,1% methanolickým roztokem kyseliny mravenčí za optimalizovaných podmínek: červená - nespikovaný extrakt, černá – spikovaný extrakt (1. β -amanitin, 2. α -amanitin, 3. falacidin, 4. falodin

4.2 Kvantitativní hodnocení HPLC-DAD analýz

Za optimalizovaných podmínek HPLC analýz byly pro účely kvantitativního hodnocení změřeny připravené série kalibračních roztoků dvojic stanovovaných toxinů (viz kap. 3.4.1) přičemž každá koncentrační úroveň kalibrace byla proměřena 5 krát. Získaná data byla statisticky zpracována na hladině spolehlivosti 0,05 a pro další použití byla zprůměrována (aritmetický průměr). Z hodnot získaných aritmetickým průměrem byly sestrojeny křivky kalibračních závislostí ploch a výšek píku na koncentraci stanovovaných toxinů.

Získané křivky všech kalibračních závislostí mají korelační koeficient vyšší než 0,99 (viz tabulky 4 a 5) a dosahují dobré linearitu.

Tabulka 4. Rovnice kalibračních přímek závislosti plochy píku na koncentraci analytu a jejich korelační koeficienty.

analyt	Rovnice kalibrační přímky	Korelační koeficient R^2
α -amanitin	$y = 4,1394x + 0,7921$	0,9998
β -amanitin	$y = 4,04482x - 0,1881$	1,0000
falacidin	$y = 4,0327x - 1,5677$	0,9999
faloidin	$y = 10,857x + 1,3621$	1,0000

Tabulka 5. Rovnice kalibračních přímek závislosti výšky píku na koncentraci analytu a jejich korelační koeficienty.

analyt	Rovnice kalibrační přímky	Korelační koeficient R^2
α -amanitin	$y = 0,635x - 0,8093$	0,9994
β -amanitin	$y = 0,5333 + 0,3893$	0,9970
falacidin	$y = 0,2616 - 0,3979$	0,9996
faloidin	$y = 0,7206x - 0,0836$	0,9998

Pomocí kalibračních rovnic závislosti výšek píku na koncentraci analytů a hodnoty šumu základní linie chromatogramu byly vypočítány limity detekce a kvantifikace viz tabulka 6.

Tabulka 6. Vypočítané limity detekce/kvantifikace pro stanovované látky.

analyt	LOD [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ [$\mu\text{g/ml}$]
α -amanitin	0,90	2,99
β -amanitin	1,07	3,56
falacidin	2,17	7,26
faloidin	0,79	2,64

Zároveň chyba měření jednotlivých kalibračních bodů, vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou, nepřesahuje 5 % s výjimkou kalibračního bodu o koncentraci 1 µg/ml pro falacidin a faloidin, kde však chyba měření není vyšší než 6,5 %. Průměrné hodnoty ploch pík z 5 měření získané aritmetickým průměrem a chyby měření jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7. Průměrné hodnoty ploch pík kalibračních bodů a chyba měření, ($n = 5$).

Koncentrace toxinů [µg/ml]	analyt	\bar{x}	RSD [%]
		Plocha píku [m.Au]	
1	α-amanitin	4,08	4,19
	β-amanitin	4,10	3,15
	falacidin	3,84	6,45
	faloidin	9,68	5,76
10	α-amanitin	40,26	1,81
	β-amanitin	40,88	1,37
	falacidin	39,58	2,69
	faloidin	113,98	1,09
25	α-amanitin	101,98	0,68
	β-amanitin	107,86	0,55
	falacidin	97,24	1,28
	faloidin	270,66	0,56
50	α-amanitin	200,40	1,56
	β-amanitin	206,38	1,64
	falacidin	198,88	1,31
	faloidin	545,16	0,90
100	α-amanitin	405,30	0,51
	β-amanitin	414,86	0,64
	falacidin	402,70	0,69
	faloidin	1086,76	0,77

4.3 Optimalizace extrakce

Připravené extrakty pomocí různých extrakčních činidel v prvním kroku pilotní extrakce měly rozdílné vlastnosti a chování. Extrakty získané methanolem a 0,1% methanolickým roztokem kyseliny mravenčí měly slabě žluté zbarvení. Zatímco extrakty, získané činnidly směs methanol:voda v poměru 1:1 (v/v) a směs methanol:voda:kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,01 mol/l v poměru 5:4:1 (v/v/v) byly hnědé a nejspíše se jimi extrahovalo větší množství barviv. Všechny extrakty po odebrání a přefiltrování přes stříkačkové mikrofiltry byly čiré.

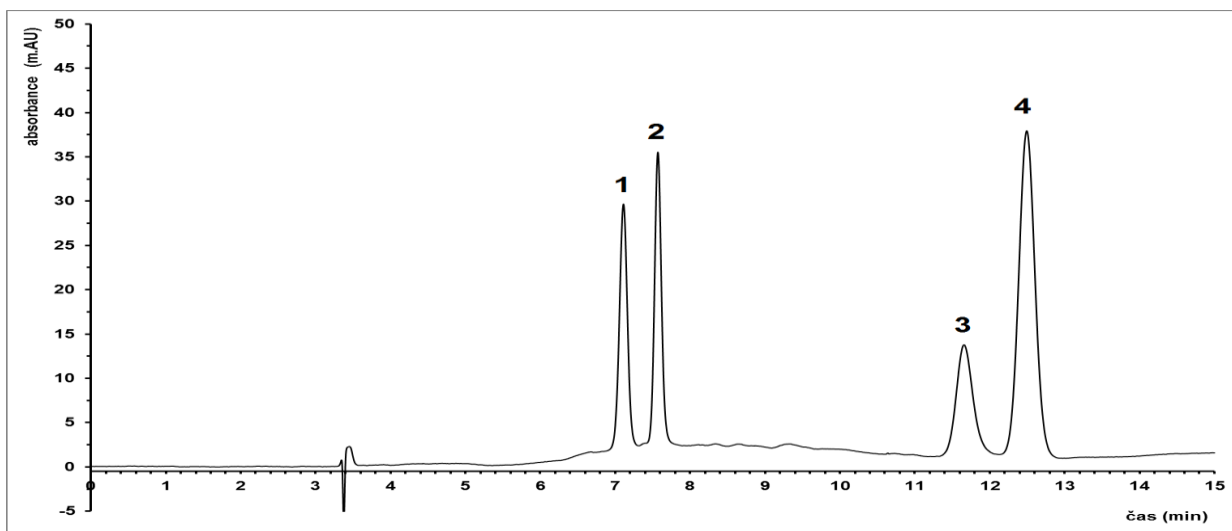
Při uchování v chladu poslední jmenované extrakty zůstaly čiré. U extraktu získaného 0,1% methanolickým roztokem kyseliny mravenčí však docházelo k precipitaci shluku bílé sraženiny, která se beze zbytku rozpouštěla při vytemperování na laboratorní teplotu. S největší pravděpodobností se jedná o chladem vysrážené bílkoviny extrahované z biologické matrice. V případě methanolického extraktu docházelo vlivem ochlazení k vypadávání bílých jehličkovitých krystalků, které se při vytemperování na laboratorní teplotu rozpouštěly minimálně. Variabilita takto krystalizujících látek je vysoká. Avšak Wieland popisuje krystalizace amanitinů z methanolických solucí [17], a je tedy možné, že se jedná o jeden z dvojice sledovaných amanitinů.

Při ředění extraktů z prvního kroku mobilní fází o složkách 1 mM vodný roztok octanu amonného s 0,1% obsahem kyseliny mravenčí a methanol v poměru 50:50 (v/v) nebylo u extraktů pozorováno zvláštní chování a byly ředěny 5 krát. U extraktů získaných v druhém kroku těmito činnidly byla však situace jiná. Při ředění extraktů získaných methanolem a 0,1% methanolickým roztokem kyseliny mravenčí docházelo ke vzniku bílého zákalu, který byl odstraněn filtrací přes stříkačkové mikrofiltry. Zbylé dva extrakty získané směsí methanol:voda v poměru 1:1 (v/v) a směsí methanol:voda: kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,01 mol/l v poměru 5:4:1 (v/v/v) zůstaly po naředění čiré.

Extrakty získané v prvním kroku za částečně optimalizovaných podmínek vykazovaly stejné vlastnosti a byly ředěny také 5 krát. K ředění bylo využito mobilní fáze o složkách 1mM vodný roztok octanu amonného okyseleného kyselinou mravenčí na $\text{pH} = 3,33$ a methanol v poměru 70:30 (v/v), tedy složení, použité na počátku gradientového programu. Touto mobilní fází byl ředěn i extrakt získaný v druhém kroku směsí methanol:voda:kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,01 mol/l v poměru 5:4:1 (v/v/v). U extraktu připraveného 0,1% methanolickým roztokem kyseliny mravenčí docházelo při ředění opět ke vzniku bílého

zákalu. Tentokrát však filtrace přes mikrofiltry nebyla natolik účinná a zákal přetrval. Proto, aby bylo možné vzorek analyzovat, bylo k ředění využito methanolu, ve kterém se bílý zákal rozpouštěl. Lze říci, že zákal byl způsoben zmenšením rozpustnosti některých látek vlivem vyššího obsahu vodné složky v mobilní fázi.

Všechny extrakty byly analyzovány za optimálních podmínek (viz kap. 4.1.3). Porovnáním se standardy (obr. 16) byla určena identita látek a pomocí kalibračních závislostí byly kvantifikovány sledované toxiny. Vhodnost extračních činidel pak byla posuzována podle množství extrahovaných toxinů.

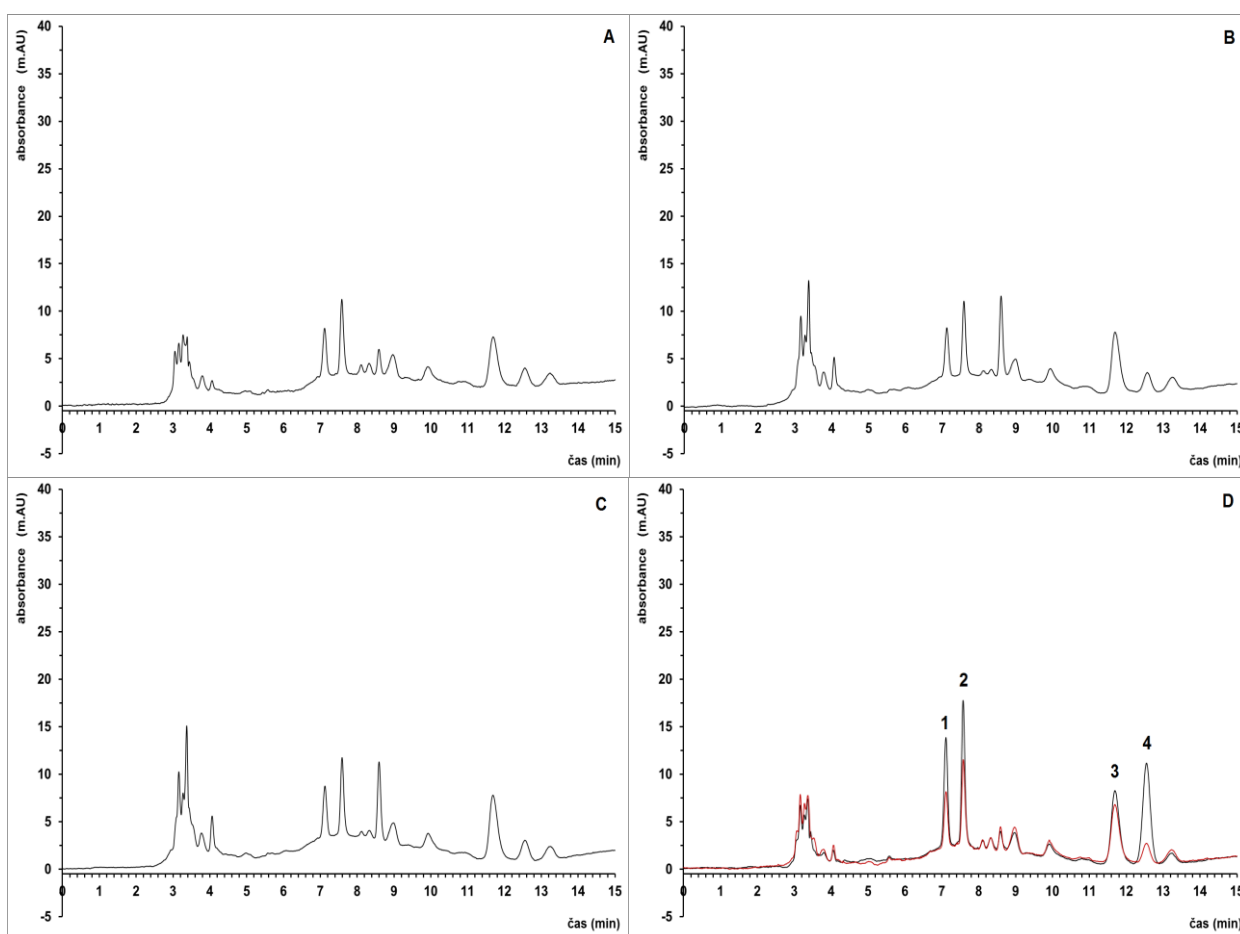


Obr. 16: Chromatogram směrného standardu toxinů naměřený za optimalizovaných podmínek gradientu (1. β -amanitin, 2. α -amanitin, 3. falacidin, 4. falodin).

4.3.1 Hodnocení pilotní extrakce

Analýzami za optimálních podmínek bylo zjištěno, že extrakty připravené různými extrakčními činidly mají prakticky stejný eluční profil a z porovnání chromatogramů (obr. 17) a se liší pouze množstvím extrahovaných látek. Malé změny v chromatogramu jsou pouze v píkovém shluku na počátku chromatogramu. Nicméně pro stanovení toxinů tento aspekt nemá význam.

Z chromatogramů byly odečteny plochy píků sledovaných látek a dosazením do rovnic kalibračních přímků vypočítány neznámé koncentrace toxinů. Vypočtené koncentrace toxinů v extraktech jsou uvedeny v tabulkách 8 až 11.



Obr. 17: Chromatogramy extraktů muchomůrky zelené naměřené za optimálních podmínek gradientu získané různými extrakčními činidly: (A) MeOH; (B) MeOH:H₂O 1:1 (v/v); (C) MeOH:H₂O:HCl (0,01M) 5:4:1 (v/v/v); (D) 0,1% methanolic roztok HCOOH; červená čára - nespikovaný extrakt, černá čára – spikovaný extrakt (1. β -amanitin, 2. α -manitin, 3. falacidin, 4. falodin).

Tabulka 8. Stanovené koncentrace sledovaných analytů v extraktu získaného v prvním a druhém kroku pilotní extrakce 0,1 % methanolickým roztokem HCOOH.

analyt	Koncentrace toxinů [μg/ml]	
	1 krok	2 krok
α-amanitin	77,43	33,3
β-amanitin	52,43	20,44
falacidin	125,56	47,29
faloidin	14,89	5,29

Tabulka 9. Stanovené koncentrace sledovaných analytů v extraktu získaného v prvním a druhém kroku pilotní extrakce methanolem.

analyt	Koncentrace toxinů [μg/ml]	
	1 krok	2 krok
α-amanitin	65,69	18,30
β-amanitin	43,25	22,84
falacidin	103,49	37,69
faloidin	10,98	4,81

Tabulka 10. Stanovené koncentrace sledovaných analytů v extraktu získaného v prvním a druhém kroku pilotní extrakce směsí MeOH:H₂O v poměru 1:1 (v/v)

analyt	Koncentrace toxinů [μg/ml]	
	1 krok	2 krok
α-amanitin	48,03	19,36
β-amanitin	74,54	24,84
falacidin	121,34	48,98
faloidin	11,81	4,83

Tabulka 11. Stanovené koncentrace sledovaných analytů v extraktu získaného v prvním a druhém kroku pilotní extrakce směsí MeOH:H₂O:HCl (0,01 M) v poměru 5:4:1 (v/v/v).

analyt	Koncentrace toxinů [μg/ml]	
	1 krok	2 krok
α-amanitin	50,87	19,61
β-amanitin	64,39	26,09
falacidin	136,47	54,53
faloidin	14,89	5,82

Při výběru vhodného extrakčního činidla byla rozhodující kromě množství extrahovaných toxinů i vlastnosti extraktu. Nakonec byla vybrána dvě činidla pro další podrobnější testování, a to 0,1% methanolický roztok kyseliny mravenčí a směs methanol:voda: kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,01 mol/l v poměru 5:4:1 (v/v/v). Methanolický extrakt byl shledán nevhodný z důvodu vzniku krystalů blíže nespecifikované látky (látek) a směs methanol:voda v poměru 1:1 měla s výjimkou β-amanitnu menší výtěžnost (viz tabulka 12). Uvedené zjištěné koncentrace toxinů nebyly pro určení vhodnosti extrakční soustavy, vzhledem ke stejným navážkám extrahovaných vzorků, vztaženy na gram navážky.

Tabulka 12. Celkové množství extrahovaných toxinů získané extrakčními činidly při pilotní extrakci.

Extrakční činidlo	Koncentrace [μg/ml]			
	α-amanitin	β-amanitin	falacidin	Faloidin
MeOH	89,99	66,09	141,18	15,79
0,1% HCOOH (MeOH)	110,73	72,87	172,85	20,18
MeOH:H ₂ O 1:1, (v/v)	67,39	99,38	170,32	16,64
MeOH:H ₂ O:HCl 5:4:1, (v/v/v)	70,48	90,48	191	20,71

4.3.2 Hodnocení extrakce za částečně optimalizovaných podmínek.

S použitím extrakčních činidel 0,1% methanolického roztoku kyseliny mravenčí a směsi methanol:voda:kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,01 mol/l v poměru 5:4:1 (v/v/v), které byly vybrány jako nejvhodnější v pilotní extrakci, byla provedena druhá a pečlivější extrakce (viz kap. 3.3.2).

Připravené extrakty byly za optimálních podmínek analyzovány a ze získaných chromatogramů byly odečteny plochy píků sledovaných analytů. Využitím rovnic kalibračních přímků byly vypočítány neznámé koncentrace toxinů v obou extraktech, které jsou uvedeny v tabulkách 13 a 14. Vypočtené koncentrace toxinů byly pro posouzení vhodnosti následně, vzhledem k rozdílné navážce vzorku, vztaženy na gram navážky vzorku. Nejvhodnější extrakční činidlo bylo nyní voleno především podle množství extrahovaných toxinů.

Tabulka 13. Stanovené koncentrace sledovaných analytů v extraktech získaných za částečně optimalizovaných podmínek 0,1 % methanolickým roztokem HCOOH.

analyt	Koncentrace toxinů [μg/ml]	
	1 krok	2 krok
α-amanitin	97,81	21,14
β-amanitin	45,75	9,28
falacidin	84,64	17,84
faloidin	20,78	4,68

Tabulka 14. Stanovené koncentrace sledovaných analytů v extraktech získaných za částečně optimalizovaných podmínek směsí MeOH:H₂O:HCl (0,01 M) v poměru 5:4:1 (v/v/v).

analyt	Koncentrace toxinů [μg/ml]	
	1 krok	2 krok
α-amanitin	63,47	40,45
β-amanitin	33,71	14,86
falacidin	78,56	28,3
faloidin	17,93	6,45

Jak ukazuje tabulka s dosaženými výsledky (tabulka 15), dosahují obě činidla při extrakci některých toxinů srovnatelných výsledků. Avšak větší množství klinicky nejdůležitějších toxinů (α - a β -amanitin) se z biologické matrice extrahuje methanolickým roztokem kyseliny mravenčí. Proto byl jako optimální extrakční činidlo vybrán právě 0,1% methanolický roztok kyseliny mravenčí a další analýzy již probíhaly pouze s extrakty získanými tímto činidlem.

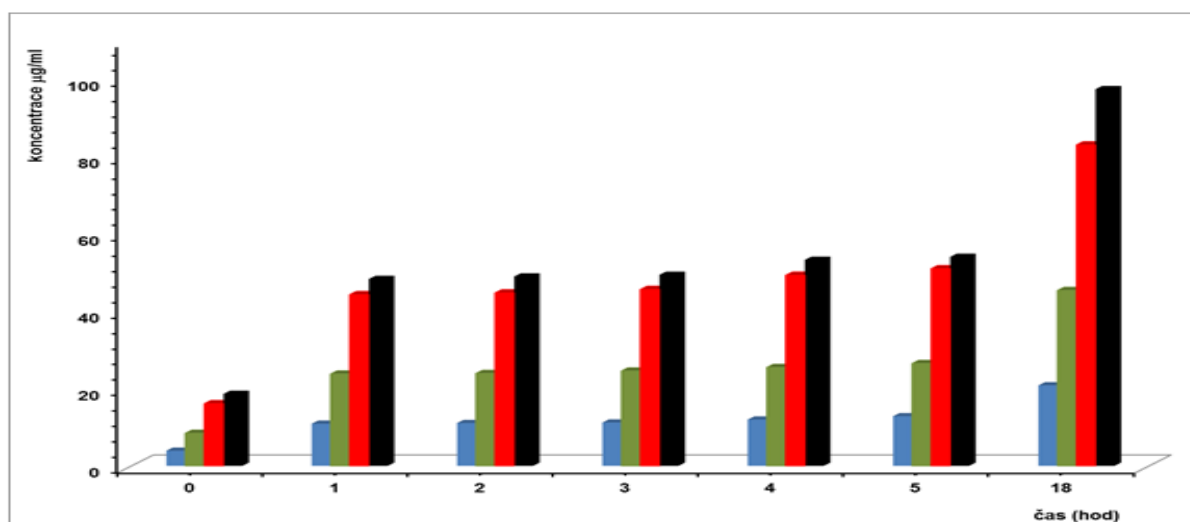
Tabulka 15. Celkové množství extrahovaných toxinů extrakčními činidly v druhé extrakci vztažené na navážku vzorku

Extrakční činidlo	Koncentrace [$\mu\text{g/g}$]			
	α -amanitin	β -amanitin	falacidin	faloidin
0,1% HCOOH (MeOH)	213,81	99,43	184,62	45,54
MeOH:H₂O:HCl 5:4:1, (v/v/v)	166,24	81,92	184,83	42,18

4.3.3 Kinetika extrakce

V průběhu extrakce za částečně optimalizovaných podmínek byly odebírány objemy 200 μl extrakčního činidla pro sledování kinetiky extrakce, jak bylo popsáno v kap. 3.3.2. Odebrané vzorky byly zpracovány a následně analyzovány pro nejvhodnější extrakční činidlo - 0,1% methanolický roztok kyseliny mravenčí.

Analýzami bylo zjištěno, že toxiny z biologické matrice přecházejí do roztoku již v okamžiku přidání extrakčního činidla. V průběhu první hodiny je extrahován největší podíl z celkového množství extrahovaných toxinů. V později odebíraných vzorcích pak bylo prokázáno, že koncentrace extrahovaných toxinů v extračním činidle vzrůstá jen mírně. Po 5 hodinách extrakce se v roztoku nachází více než polovina z celkového množství extrahovaných toxinů po 18 hodinách extrakce (viz tabulka 16 a obr. 18).



Obr. 18: Množství extrahovaných toxinů v průběhu extrakce: modrá (faloidin), zelená (β -amanitin), červená (falacidin), černá (α -amanitin).

Tabulka 16. Koncentrace toxinů v extraktu v průběhu extrakce

Čas (hod)	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]			
	α -amanitin	β -amanitin	falacidin	faloidin
0	18,57	8,41	16,05	3,89
1	48,26	23,73	44,22	10,87
2	48,9	23,87	44,67	11,04
3	49,35	24,5	45,56	11,17
4	53,2	25,41	49,23	11,94
5	53,99	26,43	50,92	12,81
18	97,31	45,3	82,91	20,78

4.4 Stanovení toxinů muchomůrky zelené

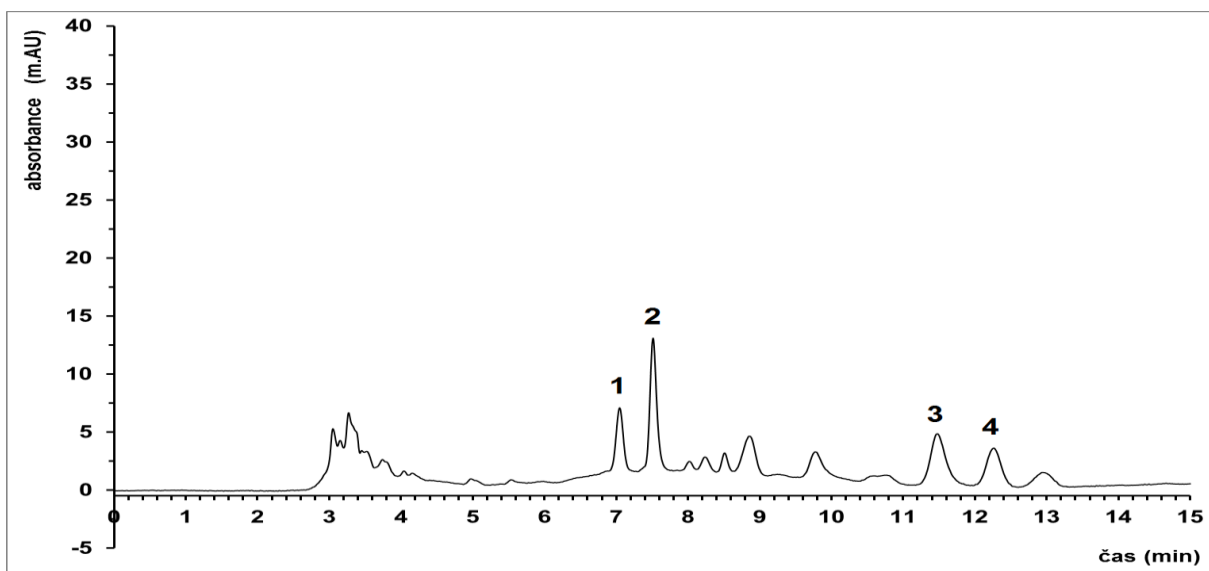
Analýzy byly provedeny na koloně Zorbax SB – Phenyl (250 × 4,6 mm, 5 μm) s využitím vysokoúčinného kapalinového chromatografu Agilent serie 1260. Za optimalizovaných podmínek gradientové eluce s použitím mobilní fáze s 1mmol/l vodným roztokem octanu amonného okyseleným kyselinou mravenčí na pH 3,33 (složka A) a methanolem (složka B) pak bylo při nástřiku 5 μl vzorku provedeno stanovení sledovaných toxinů. Ke stanovení byly využity extrakty získané v prvním i druhém kroku extrakce za částečně optimalizovaných podmínek 0,1% methanolickým roztokem kyseliny mravenčí a stanovení bylo provedeno vždy třikrát.

Srovnáním retenčních časů analytů s retenčními časy standardů sledovaných látek a později hmotnostní spektrometrií byly v extraktu identifikovány čtyři sledované analyty, a to α a β amanitin, falacidin a faloidin (obr. 19). Pro tyto analyty byly s použitím mrtvého času kolony ($t_M = 3,38$ min) vypočteny retenční faktory a selektivity. Dále bylo k hodnocení kvality separace sledovaných analytů vypočítáno rozlišení jejich píků (viz tabulka 17).

Tabulka 17. Hodnoty selektivity, rozlišení píků, retenčních časů a faktorů stanovených toxinů.

Číslo píku	analyt	t_R [min]	t_R (standard) [min]	k_i	α	$R_{1,2}$
1.	β-amanitin	7,12	7,10	1,10	---	---
2.	α-amanitin	7,58	7,57	1,24	1,12	4,30
3.	falacidin	11,69	11,70	2,45	1,97	23,89
4.	faloidin	12,25	12,51	2,62	1,07	2,49

Po identifikaci sledovaných látek byly stanovované látky v analyzovaném extraktu (obr 19) kvantifikovány a zjištěné hodnoty koncentrací byly statisticky zpracovány na hladině spolehlivosti $\alpha = 0,05$. Pro vyjádření množství toxinů obsažených v použitém kloubouku muchomůrky zelené byly koncentrace stanovené v obou extraktech sečteny a vztaženy na gram navážky vzorku. Výsledné stanovené množství toxinů je pak vyjádřeno jako množství toxinu v mikrogramech obsažených v 1 gramu kloubouku muchomůrky zelené s uvedenou chybou stanovení v podobě relativní směrodatné odchylky (viz tabulka 18).



Obr.19: Chromatogram hrubého extraktu muchomůrky zelené naměřený za optimálních podmínek (1. β -amanitin, 2. α -amanitin, 3. falacidin, 4. faloidin).

Tabulka 18. Stanovené množství sledovaných analytů v kloubouku muchomůrky zelené, ($n = 3$).

analyt	Koncentrace	RSD
	[$\mu\text{g/g}$]	[%]
α -amanitin	212,99	0,45
β -amanitin	99,32	0,78
falacidin	182,41	1,24
faloidin	45,63	0,13

Spolu s reálnými vzorky byl pro kontrolu správnosti stanovení analyzován směsný vzorek standardů o známé společné koncentraci všech sledovaných látek 50 $\mu\text{g/ml}$. Na základě naměřených koncentrací pro směsný vzorek standardů o známé koncentraci byla vypočtena chyba stanovení. Bylo dosaženo uspokojivých a správných výsledků, kdy chyba stanovení nepřesáhla hodnotu 2%.

Tabulka 19. Výsledky analýzy směšného vzorku standardů.

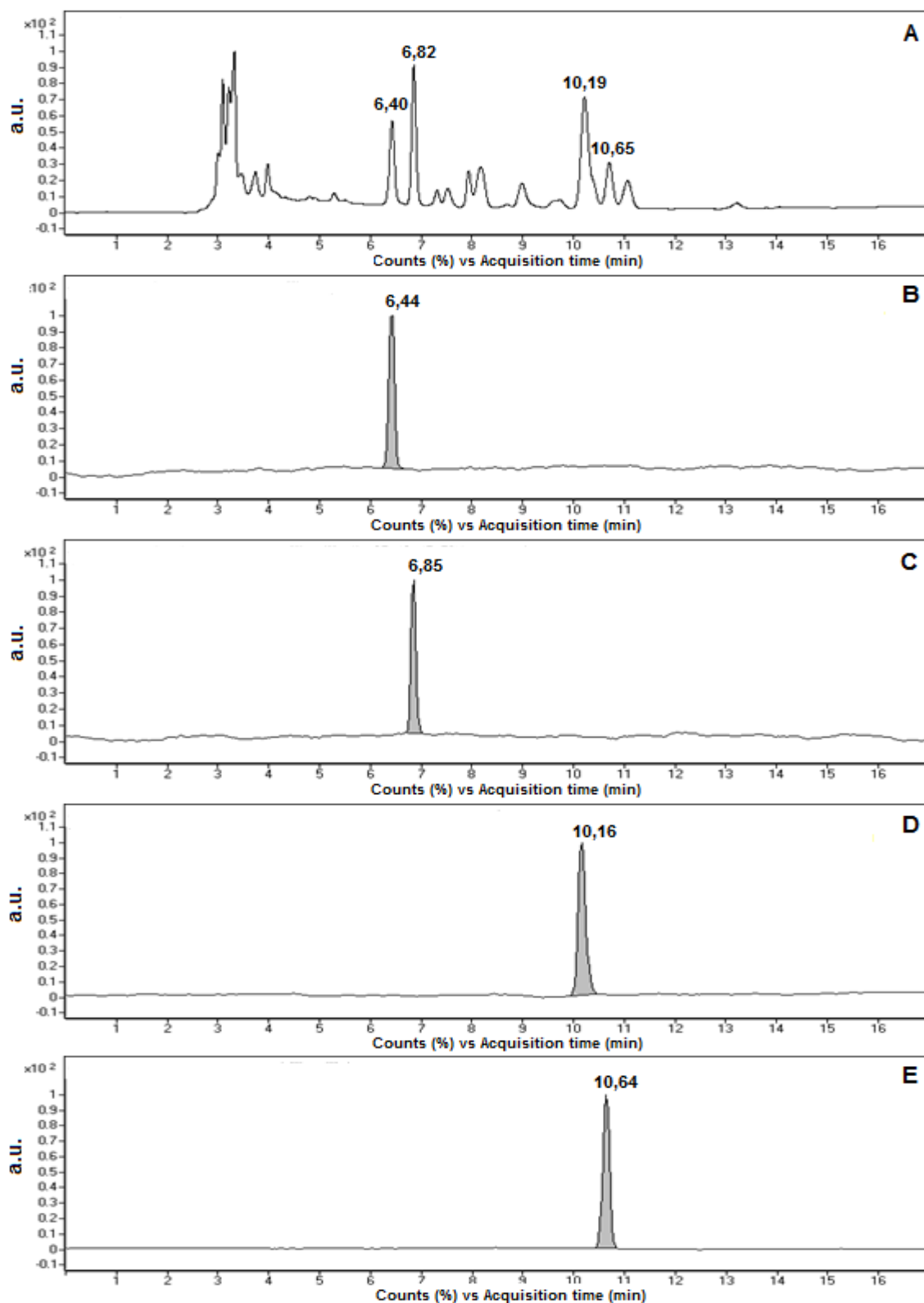
analyt	správná koncentrace	stanovená koncentrace	chyba stanovení
	[$\mu\text{g/ml}$]	[$\mu\text{g/ml}$]	[%]
α -amanitin	50	50,29	0,58
β -amanitin	50	50,81	1,62
falacidin	50	49,14	1,72
faloidin	50	50,84	1,68

4.5 Analýzy metodou HPLC-DAD-MS/MS

Analýzy metodou HPLC-DAD-MS/MS byly provedeny na koloně Zorbax SB – Phenyl (250 × 4,6 mm, 5 μm) za stejných podmínek jako stanovení metodou HPLC-DAD s použitím vyvinutého programu gradientové eluce (viz tabulka 3). Analýzy byly realizovány na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu Agilent serie 1290 Infinity s tandemově zapojeným hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólovým analyzátozem Agilent 6460 s ESI ionizací (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo).

Hmotnostní analyzátor byl nastaven pro práci v režimu pozitivních iontů a parametry hmotnostní detekce MS byly následující: fragmentor 135 V, napětí na sprejovací kapiláře \pm 4000 V, teplota desolvatačního plynu (dusíku) 350 °C, průtok desolvatačního plynu 10 l/min, nebulizer 55 psi, čas skenu 0,1 s, časová prodleva mezi skeny 0,01 s. Pro měření byl použit 5krát ředěný extrakt muchomůrky zelené získaný 0,1 % methanolickým roztokem kyseliny mravenčí. Naměřená data byla vyhodnocena v programu Agilent MassHunter (Agilent Technologies).

Při měření došlo k malému retenčnímu posunu všech analytů. Ten byl způsoben přechodem na jinou instrumentaci než která byla použita ke stanovení toxinů metodou HPLC-DAD, protože chromatograf Agilent serie 1290 Infinity byl původně konstruován pro UPLC. Sledované analyty v extraktu byly ze začátku identifikovány srovnáním retenčních časů se standardy. Získané DAD a hmotnostní chromatogramy jsou uvedeny na obrázku 20 A-E. Jak ukazuje obrázek 20A, kromě retenčního posunu došlo i ke zhoršení separace některých minoritních píků. Ty však nebyly předmětem hlavního zájmu, metoda nebyla pro dosažení lepší separace dále upravována.



Obr. 20: (A) DAD chromatogram hrubého extraktu muchomůrky zelené při 295 nm, TIC chromatogramy sledovaných analytů v ESI+ módu (B) β -amanitin, (C) α -manitin, (D) falacidin, (E) falodin; (a.u. - arbitrary unit).

Identita látek byla později potvrzena také pomocí hmotnostních spekter studovaných toxinů naměřených ve scan módu v rozmezí detegovaných hmot m/z 100 -1000.

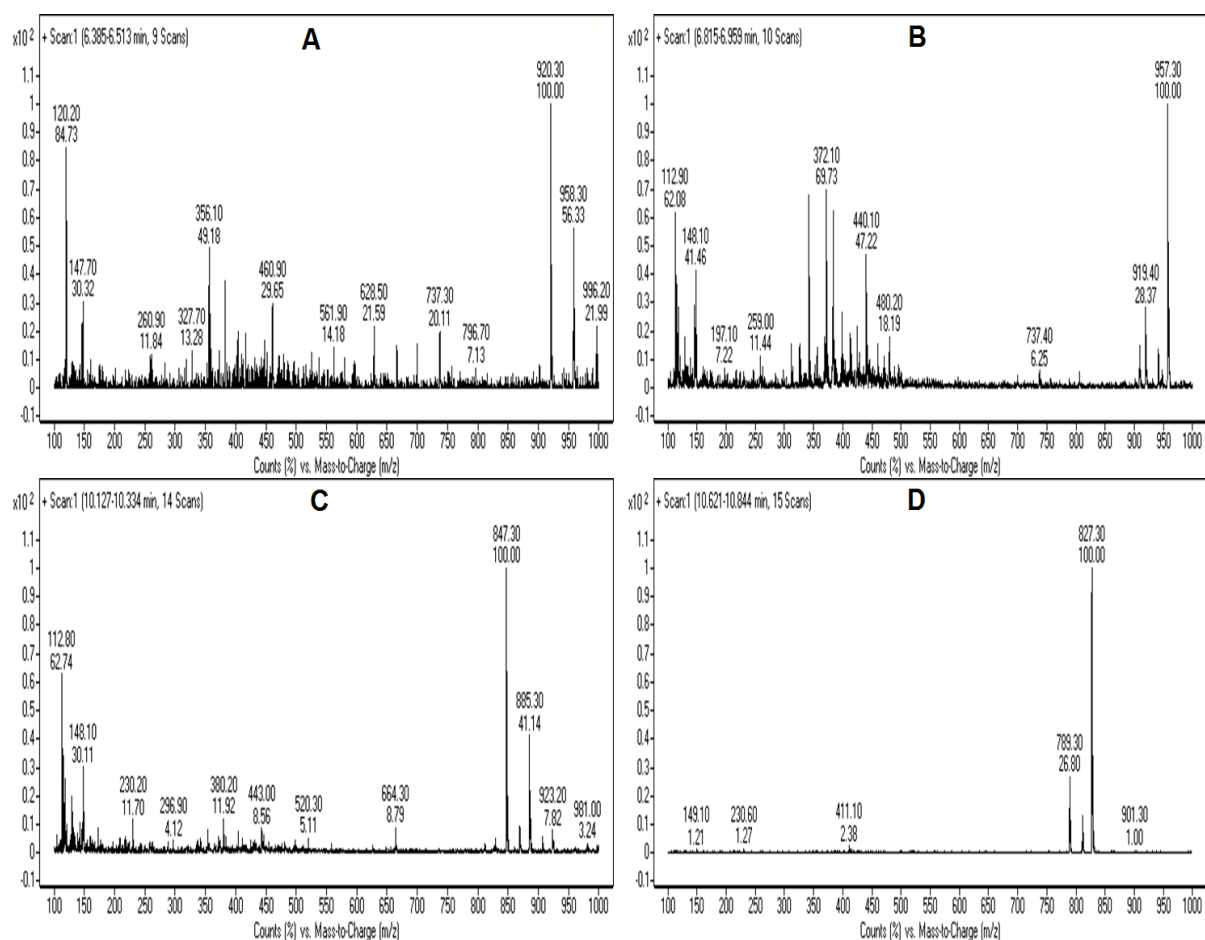
V naměřených hmotnostních spektrech byly pro sledované analyty detegovány ionty $[M+H^+]$, $[M+Na^+]$ a $[M+K^+]$ (viz tabulka 20).

Tabulka 20. Relativní molekulové hmotnosti sledovaných toxinů s nalezenými nejintenzivněji zastoupenými m/z v hmotnostním spektru

analyt	M (Da)	naměřené hmoty m/z
α -amanitin	918,97	919,3 $[M+H^+]$, 941,3 $[M+Na^+]$, 957,3 $[M+K^+]$,
β -amanitin	919,95	920,4 $[M+H^+]$, 942,3 $[M+Na^+]$, 958,3 $[M+K^+]$,
falacidin	846,90	847,3 $[M+H^+]$, 869,2 $[M+Na^+]$, 885,2 $[M+K^+]$,
faloidin	788,87	789,3 $[M+H^+]$, 811,2 $[M+Na^+]$, 827,2 $[M+K^+]$,

Ke vzniku sodných a draselných aduktů docházelo vyluhováním sodných a draselných iontů ze skleněných nádob do mobilní fáze. Získaná hmotnostní spektra vybraných toxinů muchomůrky zelené jsou uvedena na obrázku 21.

Pro popis spekter byl zaveden dvojitý popis. Horní hodnota v popisu představuje hodnotu m/z daného iontu, zatímco spodní hodnota vyjadřuje intenzitu téhož píku vyjádřenou v %, kdy nejintenzivnějšímu píku je přidělena hodnota 100%.

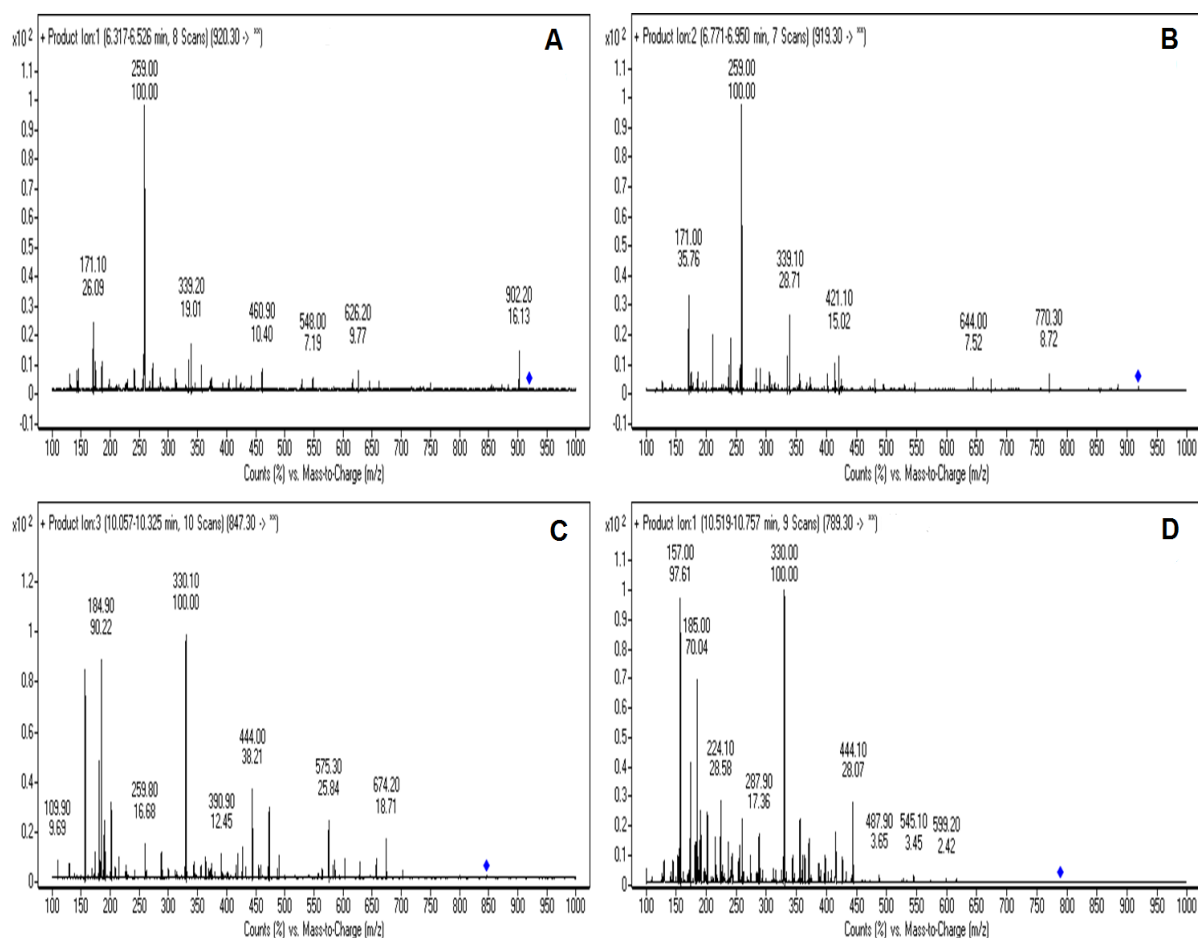


Obr. 21: Hmotnostní spektra toxinů muchomůrky zelené v ESI+ módu (A) β -amanitin, (B) α -manitin, (B) falacidin, (D) falodin.

Ze zjištěných hmot byly vybrány prekurzorové ionty pro jednotlivé analyty a měřením v tzv. „product ion“ módu byla zkoumána fragmentace a vznik produktových iontů v závislosti na použité hodnotě kolizní energie kolizního plynu. Nejdříve však bylo nutné nalézt optimální kolizní energii pro každý analyt.

Hledání vhodné kolizní energie bylo provedeno tak, že kolizní energie byla zvyšována do té doby dokud se snižovala intenzita příslušného prekurzorového iontu. Takto byly proměřeny hodnoty kolizní energie (CE) 20, 25, 30, 35, 40, 45 a 50 V.

Získaná hmotnostní spektra produktových iontů naměřená při optimálních hodnotách kolizní energie jsou uvedena na obr. 22. Popis jednotlivých píků detegovaných iontů byl proveden stejným stylem jako u hmotnostních spekter získaných měřením ve scan módu. Hodnoty zjištěných optimálních kolizních energií pro studované látky a vznikající majoritní produktové ionty jsou pak uvedeny v tabulce 21.



Obr. 22: Hmotnostní spektra produktových iontů toxinů muchomůrky zelené v ESI+ módu (A) β -amanitin – CE = 40 V, (B) α -amanitin – CE = 45 V, (B) falacidin – CE = 45 V, (D) faloidin – CE = 50 V.

Tabulka 21. Hodnoty m/z prekurzorových a nalezených produktových iontů při optimalizované kolizní energii.

analyt	prekurzorový ion (m/z)	produktové ionty (m/z)	Kolizní energie (V)
α -amanitin	919,3	259,0; 339,10; 644,0; 770,30	45
β -amanitin	920,4	259,0; 339,20; 626,20; 902,20	40
falacidin	847,3	184,90; 259,80; 330,10; 575,30	45
faloidin	789,3	157,00; 185,00; 224,1; 330,00	50

5. Závěr

Jak bylo řečeno úvodem, každoročně dochází ve světě i v České republice k řadě houbových otrav. Z tohoto hlediska je nejvýznamnější nejjedovatější houba světa muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*), která působí smrtelné otravy i po tepelné úpravě či delším skladování v mrazáku. V současné době v naší republice stále ještě chybí vhodné analytické postupy pro rutinní toxikologickou praxi k objektivní diagnostice houbových intoxikací a k vyšetření houbových otrav se stále používají metody, založené na mikroskopické identifikaci houbových spor. Tato metoda však, jak již bylo popsáno v úvodu, nemusí být vždy proveditelná a spolehlivá. Ve snaze vyvinout vhodný analytický postup pro budoucí rutinní toxikologickou praxi byly s použitím klobouku muchomůrky zelené provedeny pilotní experimenty, zahrnující izolaci a stanovení vybraných toxinů falacidinu, faloidinu a toxikologicky významných amanitinů (α - a β -amanitin) z biologické matrice.

Při provedených testech bylo nalezeno vhodné extrakční činidlo 0,1% methanolický roztok kyseliny mravenčí, pro který byla sledována i kinetika extrakce studovaných toxinů. Během sledování kinetiky extrakce bylo zjištěno, že toxiny jsou extrahovány již v okamžiku přidání extrakčního činidla.

Pro analýzu toxinů byla vyvinuta metoda HPLC-DAD za použití lineární gradientové eluce s mobilními fázemi (A) 1mM vodný roztok octanu amonného okyseleného kyselinou mravenčí na pH 3,33 a (B) 100% methanol. Vyvinutou metodou byly v extraktu z klobouku muchomůrky zelené identifikovány vybrané toxiny porovnáním jejich retenčních časů s retenčními časy standardů. Během vývoje HPLC metody byla pozorována velká závislost retence amanitinů na pH použité vodné složky mobilní fáze, a to hlavně β -amanitinu obsahující karboxylovou skupinu. Toxiny byly kvantifikovány pomocí rovnic naměřených kalibračních závislostí a výsledek byl vyjádřen jako množství toxinů obsažených v 1 gramu klobouku muchomůrky zelené. Takto byl v klobouku dospělé plodnice muchomůrky zelené stanoven obsah α -amanitinu 212,99 $\mu\text{g/g}$, β -amanitinu 99,32 $\mu\text{g/g}$, falacidinu 182,41 $\mu\text{g/g}$ a faloidinu 45,63 $\mu\text{g/g}$.

Později byla vyvinutá metoda využita i pro podrobnější analýzy toxinů metodou HPLC-DAD-MS/MS, kterou byla potvrzena identita toxinů i na základě získaných hmotnostních spekter. Ve spektrech byly nalezeny hmoty sledovaných toxinů m/z odpovídající vzniklým iontům $[\text{M}+\text{H}^+]$, $[\text{M}+\text{Na}^+]$ a $[\text{M}+\text{K}^+]$. Identita byla potvrzena na základě zjištěných hmot

vzniklých $[M+H^+]$ iontů, a to 919,3 (α -amanitin), 920,4 (β -amanitin), 847,3 (falacidin) a 789,3 (faloidin)

Dále byly při studiu vzniku produktových iontů nalezeny optimální kolizní energie potřebné k fragmentaci prekurzorových iontů sledovaných látek.

Tato práce bude dále použita pro vývoj metody stanovení toxinů v biologických matricích užívaných v klinické praxi jako je krev, moč, žaludeční výplach, stolice a další.

6. Literatura

1. Escudié L., Francoz C., Vinel J.P., et al., Amanita phalloides poisoning: Reassessment of prognostic factors and indications for emergency liver transplantation. *J Hepatol*, 2007. **46**: p. 466-473.
2. Kaya E., Yilmaz I., Sinirlioglu Z.A., et al., Amanitin and phallotoxin concentration in Amanita phalloides var. alba mushroom. *Toxicon*, 2013. **76**: p. 225-233.
3. Erden A., Esmeray K., Karagöz H., et al., Acute liver failure caused by mushroom poisoning: A case report and review of the literature. *Int Med Case Rep J*, 2013. **6**: p. 85-90.
4. Merová B. , Staňková M., Stříbrný J. a Ondra P., LC-MS: Objektivní metoda diagnostiky intoxikací muchomůrkami. *Chem List*, 2012. **106**: p. 831-835.
5. Bonnet M.S., Basson P.W., The toxicology of Amanita phalloides. *Homeopathy*, 2002. **91** (October 2001): p . 249-254.
6. Leite M., Freitas A., Azul A.M., Barbosa J., Costa S., Ramos F., Development, optimization and application of an analytical methodology by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of amanitins in urine and liver samples. *Anal Chim Acta.*, 2013. **79**: p. 977-87.
7. Göransson U., Burman R., Gunasekera S., Strömstedt A. a Rosengren K.J., Circular proteins from plants and fungi. *J Biol Chem.*, 2012. **287**: p.27001-27006.
8. Santi L., Maggioli C., Mastroberto M., Tufoni M., Napoli L., Caraceni P., Acute Liver Failure Caused by Amanita phalloides Poisoning. *Int J Hepatol.*, 2012. **2012**: p. 1-6.
9. Maurer H.H., Schmitt C.J., Weber A. a Kraemer T., Validated electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric assay for the determination of the mushroom toxins α - and β -amanitin in urine after immunoaffinity extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, 2000. **748**: p. 125-135.
10. Dvořák R., Amanita phalloides - muchomůrka zelená. *Česká Mykol společnost*. 2011: staženo dne 17.2.2015, dostupné na www.myko.cz/clanek198/.
11. Vetter J., Toxins of Amanita phalloides. *Toxicon*, 1998. **36** (1): p. 13-24.
12. Zhang P., Chen Z., Hu J., Wei B., Zhang Z., Hu W., Production and characterization of Amanitin toxins from a pure culture of Amanita exitialis. *FEMS Microbiol Lett.*, 2005. **252**: p. 223-228.

13. Hallen H.E., Luo H., Scott-Craig J.S., Walton J.D., Gene family encoding the major toxins of lethal Amanita mushrooms. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2007. **104** (48): p. 19097-19101.
14. Jordan P a Wheeler S., Velká kniha o houbách. *Trio Publ s.r.o* , Bratislava. 2001: p. 108, 109. překlad anglického originálu (The Ultimate Mushroom Book, London 1995).
15. Mcknight T.A., Mcknight K.B., Skeels M.C. et al., Amatoxin and phallotoxin concentration in Amanita bisporigera spores Amatoxin bispotigera. *Mycol Soc Am.*, 2015. **102** (4): p. 763-765.
16. Nomura M., Suzuki Y., Kaneko R. et al., Simple and rapid analysis of amatoxins using UPLC-MS-MS. *Forensic Toxicol.*, 2012. **30**: p. 185-192.
17. Wieland T., Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms. *Springer, New York*. 1986.
18. Frass M., Zagorchev P., Yurukova V. et al., Two Cases of Fulminant Hepatic Failure from Amanita phalloides Poisoning Treated Additively by Homeopathy. *Ochsner J.*, 2014. **14** (2): p. 252-258.
19. Vargas N., Bernal A., Sarria V., Franco-Molano A., Restrepo S., Amatoxin and phallotoxin composition in species of the genus Amanita in Colombia: A taxonomic perspective. *Toxicon*, 2011. **58** (6-7): p. 583-590.
20. Li C., Oberlies N.H., The most widely recognized mushroom: Chemistry of the genus Amanita. *Life Sci.*, 2005. **78**: p. 532-538.
21. Enjalbert F., Gallion C., Jehl F., Monteil H., Toxin content, phallotoxin and amatoxin composition of Amanita phalloides tissues. *Toxicon.*, 1993. **31**: p.803-807.
22. Enjalbert F., Cassanas G., Rapior S., Renault C., Chaumont J-P., Amatoxins in wood-rotting Galerina marginata. *Mycologia*. 2004. **96** (4): p. 720-729.
23. Himmelmann A., Mang G., Schnorf-Huber S., Lethal ingestion of stored Amanita phalloides mushrooms. *Swiss Med Wkly*. 2001. **131** (41-42): p. 616-617.
24. Sgambelluri R.M., Epis S., Sasserà D., Luo H., Angelos E.R., Walton J.D., Profiling of Amatoxins and Phallotoxins in the Genus Lepiota by Liquid Chromatography Combined with UV Absorbance and Mass Spectrometry. *Toxins (Basel).*, 2014. **6**: p. 2336-2347.

25. Letschert K., Faulstich H., Keller D., Keppler D., Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes. *Toxicol Sci.*, 2006. **91** (1): p. 140-149.
26. Kroncke K.D., Fricker G., Meier P.J., Gerok W., Wieland T., Kurz G., α -Amanitin uptake into hepatocytes. Identification of hepatic membrane transport systems used by amatoxins. *J Biol Chem.* 1986. **261** (27): p. 12562-12567.
27. Defendenti C., Bonacina E., Mauroni M., Gelosa L., Validation of a high performance liquid chromatographic method for alpha amanitin determination in urine. *Forensic Sci Int.* 1998. **92**: p. 59-68.
28. Ahmed W.H.A., Gonmori K., Suzuki M., Watanabe K., Suzuki O., Simultaneous analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Forensic Toxicol.*, 2010. **28**: p. 69-76.
29. Douša M., Nováková L., Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. *Europrint a.s., Praha.* 2013.
30. Enjalbert F., Gallion C., Jehl F., Monteil H., Faulstich H., Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.*, 1992. **598**: p. 227-236.
31. Enjalbert F., Bourrier M.J., Andary C., Assay for the main phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. by direct fluorimetry on thin-layer plates. *J Chromatogr.* 1989. **462**: p. 442.
32. Zhi Zhou, Min Cao, Liping Zhou, Xiongjun Zou Y.T., Determination of α -Amanitin in Human Serum by Solid-Phase Extracton Coupled with HPLC-UV. *LCGC North Am.* 2011. **29** (8).
33. Gonmori K., Minakata K., Suzuki M., et al., MALDI-TOF mass spectrometric analysis of α -amanitin, b-amanitin, and phalloidin in urine. *Forensic Toxicol.*, 2012. **30**: p. 179-184.
34. Turner N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A., Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal Chim Acta.* 2009. **632** (2): p. 168-180.
35. Gulikova D.K., Gainullina E.T., Ponsov M.A., Rybal'chenko I.V., Ryzhikov S.B., Fateenkov V.N., A rapid test for toxins from *Amanita phalloides* mushrooms. *J Anal Chem.*, 2013. **68**: p. 1089-1092.

36. Sullivan G., Brady L.R., Tyler V.J., Identification of α - and β -Amanitin by Thin-Layer Chromatography. *J Pharm Sci.*, 1965. **54** (6): p. 921-922.
37. Stijve T., Seeger T., Determination of alpha-, beta-, and gamma-amanitin by high performance thin-layer chromatography in *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) secr. from various origin. *Z Naturforsch C.*, 1979. **34** (12): p. 1133-1138.
38. Deng W.-Q., Li T.-H., Xi P.-G., Gan L.-X., Xiao Z.-D., Jiang Z.-D., Peptide toxin components of *Amanita exitialis* basidiocarps. *Mycologia.*, 2011. **103** (5): p. 946-949.
39. Pastorello L., Tolentino D., D'Alterio M., Paladino R., Frigerio A., Bergamo N., Valli A., Determination of alpha-amanitin by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1982. **233**: p. 398.
40. Maurer H.H., Kraemer T., Ledvinka O., Schmitt C.J., Weber A.A., Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in toxicological analysis. Studies on the detection of clobenzorex and its metabolites within a systematic toxicological analysis procedure by GC-MS and by immunoassay and studies on the detection of alpha- and beta-amanitin in urine by atmospheric pressure ionization electrospray LC-MS. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, 1997. **689** (1): p. 81-89.
41. Chung W., Tso S., Sze S., Separation of polar mushroom toxins by mixed-mode hydrophilic and ionic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci.*, 2007. **45** (2): p. 104-111.
42. Brüggemann O., Meder M., Freitag R., Analysis of amatoxins alpha-amanitin and beta-amanitin in toadstool extracts and body fluids by capillary zone electrophoresis with photodiode array detection. *J Chromatogr A.*, 1996. **744** (1-2): p. 167-176.
43. Robinson-Fuentes V.A., Jaime-Sánchez J.L., García-Aguilar L., Gómez-Peralta M., Vázquez-Garcidueñas M.S., Vázquez-Marrufo G., Determination of alpha- and beta-amanitin in clinical urine samples by Capillary Zone Electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal.*, 2008. **47** (4-5): p. 913-917.
44. Rittgen J., Pütz M., Pyell U., Identification of toxic oligopeptides in *Amanita* fungi employing capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry with positive and negative ion detection. *Electrophoresis.*, 2008. **29** (10): p. 2094-2100.

45. Abuknesha R.A., Maragkou A., A highly sensitive and specific enzyme immunoassay for detection of beta-amanitin in biological fluids. *Anal Bioanal Chem.*, 2004. **379** (5-6): p. 853-860.
46. Gausterer C., Penker M., Krisai-Greilhuber I., Stein C., Stimpfl T., Rapid genetic detection of ingested Amanita phalloides. *Forensic Sci Int Genet.*, 2014. **9** (1): p. 66-71.
47. Kazakevich Y., LoBrutto R., HPLC for Pharmaceutical Scientists. *Wiley&Sons. Hoboken, New Jersey*. 2007.: p. 1-1104.
48. Kellner R., Mermet H.J., Otto M., Valcárcer M., Widmer M.H., Analytical chemistry: a modern approach to analytical science. 2nd ed.: *Wiley-VCH, Weinheim*. 2004.
49. Douša M., Nováková L., Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. *Europoint a.s, Praha*. 2013.
50. Martinez C.R., Iverson B.L., Rethinking the term “pi-stacking.” *Chem Sci.*, 2012. **3** (7): p. 2191.
51. Clarke D. B., Lloyd S. A., Robba P., Application of liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry separation for rapid assessment of toxins in Amanita mushrooms. *Anal Methods.*, 2012. **4**: p. 1298-1309.
52. Coufal P., High Performance Liquid Chromatography, HPLC. *Univerzita Karlova v Praze*. 1996. staženo dne 3.4.2015, dostupné na web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.
53. Filigenzi M.S., Poppenga R.H., Tiwary A.K., Puschner B., Determination of alpha-amanitin in serum and liver by multistage linear ion trap mass spectrometry. *J Agric Food Chem.*, 2007. **55** (8): p. 2784-2790.
54. Di Girolamo F., Lante I., Muraca M., Putignani L., The Role of Mass Spectrometry in the “Omics” Era. *Curr Org Chem.*, 2013. **17** (23): p. 2891-2905.
55. Banerjee S., Mazumdar S., Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem.*, 2012. **2012**: p. 1-40. Halada P., Hmotnostní s spektrometrie pektrometrie peptid peptidů a proteinů., *MBÚ AV ČR*. staženo dne 12.4.2015. dostupné na www.uhkt.cz/files/proteomika/Druhy_den - Principy_MS.
56. GROSS Jürgen H., Mass spectrometry: a textbook.: *Springer, Berlin*. 2004.