

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Hrabáková

HPLC-MS/MS analýza toxinů z *Psilocybe semilanceata*

HPLC-MS/MS analysis of toxins from *Psilocybe semilanceata*

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2021

Prohlášení

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

Jsem si vědoma 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 18. června 2021.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce prof. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za její trpělivost, vstřícnost a cenné rady při zpracovávání této bakalářské práce i za vytvoření přátelského pracovního prostředí. Děkuji také RNDr. Tomáši Hložkovi, Ph.D. za spolupráci na experimentální části této práce a RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za poskytnutí odborné konzultace.

Poděkování patří bezpochyby i mojí rodině a přátelům za podporu během celého mého studia, děkuji především Ing. Dominice Hrabákové, Bc. Kateřině Hrabákové a Lucii Hřebíkové za jejich rady, slova povzbuzení i jejich modlitby. A děkuji také Bohu za vedení v každé životní situaci.

Obsah

1	Úvod	8
1.1	Nebezpečí houbových intoxikací.....	8
1.2	Cíle práce.....	9
2	Teoretická část	10
2.1	Houby rodu <i>Psilocybe</i>	10
2.1.1	Lysohlávka kopinatá (<i>Psilocybe semilanceata</i>)	10
2.1.2	Lysohlávka tajemná (<i>Psilocybe arcana</i>)	11
2.1.3	Lysohlávka česká (<i>Psilocybe bohemica</i>).....	11
2.1.4	Lysohlávka moravská (<i>Psilocybe moravica</i>).....	12
2.1.5	Intoxikace houbami rodu <i>Psilocybe</i>	13
2.1.6	Zneužití jako rekreační drogy.....	13
2.1.7	Využití v lékařství	14
2.2	Toxiny obsažené v <i>Psilocybe semilanceata</i>	14
2.2.1	Psilocin a psilocybin.....	14
2.2.2	Baeocystin a norbaeocystin	16
2.3	Metody analýzy toxinů z hub	16
2.3.1	Extrakce	17
2.3.2	Kapalinová chromatografie	18
2.3.3	UV/VIS detekce.....	20
2.3.4	Hmotnostní spektrometrie	21
2.3.5	Metody extrakce psilocinu a psilocybinu z biologického materiálu	23
2.3.6	Metody identifikace a stanovení psilocinu a psilocybinu.....	23
2.4	Vyhodnocení chromatografických analýz	24
2.4.1	Kvalitativní hodnocení	25
2.4.2	Kvantitativní hodnocení	25
3	Experimentální část	27
3.1	Použité chemikálie.....	27
3.2	Instrumentace.....	28
3.3	Přímá extrakce toxinů lysohlávky kopinaté.....	29
3.4	Úprava pH vodné složky mobilní fáze	30

3.5	Příprava a uchování vzorků pro HPLC analýzy	30
3.5.1	Příprava standardních roztoků a roztoků pro kalibraci.....	30
3.5.2	Příprava reálných vzorků.....	31
3.5.3	Uchování standardních roztoků a reálných vzorků	31
3.6	Kvalitativní hodnocení analýz	31
3.7	Kvantitativní hodnocení analýz	32
4	Výsledky a diskuse.....	33
4.1	Optimalizace tandemové hmotnostní detekce	33
4.2	Výběr chromatografického systému.....	34
4.2.1	Separace v RP-HPLC módu se stacionární fází C18.....	35
4.2.2	Separace v RP-HPLC módu se stacionární fází C8.....	38
4.2.3	Separace v RP-HPLC módu se stacionární fází fenyl-hexyl.....	39
4.2.4	Separace metodou ZIC-cHILIC	40
4.2.5	Separace metodou BEH-HILIC	40
4.3	Optimalizace HPLC-MS/MS analýzy s gradientem mobilní fáze.....	44
4.4	Kvantitativní hodnocení HPLC-MS/MS analýz.....	46
4.4.1	Kalibrační řada vodných roztoků toxinů	47
4.4.2	Kalibrační řada roztoků toxinů ve směsi acetonitril:voda (1:1)	47
4.5	Optimalizace extrakce	49
4.5.1	Extrakce methanolem	50
4.5.2	Extrakce hluboce eutektickými rozpouštědly	53
4.6	Stanovení obsahu toxinů v lysohlávce kopinaté.....	57
4.6.1	Porovnání obsahů zjištěných při různých způsobech extrakce	57
4.6.2	Celkový obsah toxinů stanovený při extrakci methanolem.....	58
5	Závěr.....	60
	Použitá literatura.....	61
	Použité obrázky	66

Seznam použitých zkratk a symbolů

<i>a</i>	selektivita
<i>A</i>	plocha píku [AU min]
AU	relativní měrná jednotka (Arbitrary Unit)
<i>b</i>	směrnice kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci analytu
BEH-HILIC	HILIC s hybridní stacionární fází s ethylenovými můstky (ethylene-bridged hybrid HILIC)
<i>c</i>	molární koncentrace [mol/l]
<i>c_m</i>	hmotnostní koncentrace [g/l]
C8	oktylová skupina
C18	oktadecylová skupina
CI	chemická ionizace (chemical ionization)
CID	kolizně indukovaná disociace (collision-induced dissociation)
CORONA	nemá český název (corona charged aerosol detector)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis)
DES	hluboce eutektická rozpouštědla (deep eutectic solvents)
EI	elektronová ionizace (electron ionization)
ELISA	nemá český název (enzyme-linked immunosorbent assay)
ELSD	nemá český název (evaporative light scattering detector)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
FAB	ostřelování vzorků rychlými atomy (fast atom bombardment)
FD	desorpce elektrickým polem (field desorption)
FI	ionizace elektrickým polem (field ionization)
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
<i>h</i>	výška píku [AU]
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (hydrophilic interaction chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
HS	vysoká stabilita (high stability)

IS	vnitřní standard (internal standard)
k	retenční faktor
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LD ₅₀	letální dávka neboli dávka látky, která je smrtelná pro 50 % testovaných organismů
LOD	mez detekce (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)
LSD	diethylamid lysergové kyseliny
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption ionization)
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
m/z	poměr hmotnosti a náboje iontu
n	počet měření
NP-HPLC	HPLC s normálními fázemi (normal phase HPLC)
PDA	detektor s diodovým polem (photodiode array detector)
psi	anglosaská jednotka tlaku (pounds per square inch)
R	intenzita signálu [AU]
R^2	koeficient determinace
$R_{1,2}$	rozlišení dvou sousedních píků
RP-HPLC	HPLC s reverzními fázemi (reversed phase HPLC)
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
RSD	relativní směrodatná odchylka měření (relative standard deviation) [%]
SF	stacionární fáze
SIM	monitoring jediného iontu (single ion monitoring)
TIS	Toxikologické informační středisko
TLC	tenkovrstvá chromatografie (thin-layer chromatography)
t_M	mrtvý čas [min]
TOF	doba letu (time of flight)
t_R	retenční čas analytu [min]
TSI	ionizace termosprejem (thermospray ionization)

UV/VIS	ultrafialovo-viditelné světlo (ultraviolet–visible light)
v/v	poměr objemů
w	šířka píku při základně [min]
ZIC-HILIC	zwitteriontová HILIC (zwitterionic HILIC)

1 Úvod

1.1 Nebezpečí houbových intoxikací

Celosvětově je známo asi 300 až 400 tisíc druhů hub, z toho více než 90 % patří mezi mikromycety (mikroskopické houby) a pouze 15 až 20 tisíc patří mezi makromycety, tedy houby s plodnicí větší než 1 mm (cit. ¹). V Evropě se vyskytuje přibližně 6 tisíc druhů makroskopických hub, z toho jen asi 180 druhů je jedovatých nebo z jedovatosti podezřelých².

Sběr a konzumace hub jsou mezi lidmi oblíbené již po dlouhá staletí. K intoxikacím dochází nejčastěji záměnou jedlé houby za houbu jedovatou nezkušeným houbařem. Příčinou intoxikace však může být i záměrná otrava s vražedným či sebevražděným úmyslem nebo zneužití některých rodů hub, například rodu *Psilocybe*, pro jejich psychotropní účinky. Většina houbových toxinů způsobuje mírné nebo středně závažné zdravotní potíže, avšak některé z toxinů, například amatoxiny, vyvolávají velmi těžké až smrtelné otravy².

V České republice poskytuje informace o první pomoci a léčení akutních otrav Toxikologické informační středisko (TIS), které v současné době podává více než 20 tisíc toxikologických konzultací ročně, z toho asi 2–3 % tvoří konzultace spojené s houbami³. S diagnózou T62.0 (požití hub) bylo podle informací z Národního registru hospitalizovaných, poskytnutých Ústavem zdravotnických informací a statistiky ČR v letech 2007–2016, hospitalizováno ročně průměrně 166 pacientů⁴.

Při houbových intoxikacích je důležité určit druh houby zodpovědné za otravu. To může být provedeno mikroskopickým mykologickým vyšetřením zbytků jídla obsahujícího houby, zvratků, stolice či žaludečního výplachu intoxikovaného jedince. Tyto subjektivní mikroskopické metody však nesou mnohá úskalí, jako je nevhodný odběr vzorku či nedostatečná erudovanost odborníka, který vyšetření provádí, a tedy hrozící chybná diagnostika. K objektivní diagnostice houbových intoxikací z tělních tekutin pacientů lze využít chromatografických metod, jako je například vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)^{5–7}.

Průkaz psilocybinové intoxikace je významný v soudním lékařství, jelikož psilocybin i psilocin patří v České republice mezi nedovolené omamné a psychotropní látky podle nařízení vlády č. 467/2009 Sb. vztahujícího se k § 289 zákona č. 40/2009 Sb. Nedovolené je

přechovávat množství větší než 40 plodnic hub obsahujících psilocin a/nebo psilocybin nebo 0,05 g báze (psilocinu) či odpovídajícího množství psilocybinu. K průkazu a stanovení psilocinu se využívá především kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) nebo plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS)⁸.

1.2 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout metodu kapalinové chromatografie s detekcí tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS) pro analýzu vybraných toxinů (psilocinu a psilocybinu) v lysohlávce kopinaté (*Psilocybe semilanceata*).

Cílem počátečních experimentů bylo optimalizovat HPLC-MS/MS metodu s isokratickou elucí, a to sledováním separace směšného roztoku standardů psilocinu a psilocybinu za využití různých chromatografických kolon a různých mobilních fází. Pro zvolenou optimální chromatografickou kolonu bylo nutné navrhnout gradientovou eluci.

Dalším cílem bylo provést přímou extrakci analytů z vysušené plodnice lysohlávky kopinaté pomocí methanolu a poté pomocí hluboce eutektických rozpouštědel, vhodně upravené extrakty analyzovat optimalizovanou HPLC-MS/MS metodou a stanovit obsah psilocinu a psilocybinu ve vybraných plodnicích lysohlávky kopinaté.

2 Teoretická část

2.1 Houby rodu *Psilocybe*

Existuje přibližně 180 uznávaných druhů lysohlávek, z toho asi 95 je halucinogenních⁹. Značné množství lysohlávek roste také v České republice, mezi nimi nejrozšířenější je lysohlávka kopinatá (*Psilocybe semilanceata*), dále je to například lysohlávka tajemná (*Psilocybe arcana*), lysohlávka česká (*Psilocybe bohemica*) či lysohlávka moravská (*Psilocybe moravica*)^{10, 11}.

2.1.1 Lysohlávka kopinatá (*Psilocybe semilanceata*)

Lysohlávka kopinatá (znázorněna na obrázku 1) je jedovatá lupenatá houba s 15–30 mm širokým, kuželovitým až zvoncovitým kloboukem s výrazným bradavkovitým hrbolkem. Klobouk má olivově hnědou barvu vysychající do slámově žlutého zbarvení. Lupeny jsou přirostlé až připojené, tmavohnědé s bělavým vločkatým ostřím. Třeň dosahuje výšky 50–120 mm a tloušťky 1–3,5 mm, je hladký, světle hnědý^{1, 11}.

Roste v období od srpna do listopadu, lze ji nalézt například v trávě na loukách a pastvinách nebo podél cest. Druh je dobře rozeznatelný díky charakteristickému tvaru klobouku a sklonu k zelenomodraní třeně po otlačení, záměny proto nejsou příliš časté^{1, 12}.



Obrázek 1: *Psilocybe semilanceata*

2.1.2 Lysohlávka tajemná (*Psilocybe arcana*)

Plodnice lysohlávky tajemné (znázorněna na obrázku 2) se od lysohlávky kopinaté liší především vzhledem klobouku, který dosahuje šířky 20–60 mm a je charakteristický nízkým širokým hrbolek, má šedohnědou až slámově žlutavou barvu. Jedná se o lupenatou houbu, lupeny jsou hnědé, na ostří pak bělavé. Třeň je dutý, při poranění zelenomodrající. Roste od září do listopadu v listnatých a jehličnatých lesích. Lysohlávka tajemná patří mezi jedovaté houby¹¹.



Obrázek 2: *Psilocybe arcana*

2.1.3 Lysohlávka česká (*Psilocybe bohemica*)

Lysohlávka česká (znázorněna na obrázku 3) je jedovatá lupenatá houba s 12–25 mm širokým, zvoncovitým, nízce sklenutým kloboukem karamelově hnědé až krémové barvy. Třeň je vláknitý, krémový, odspodu špinavě modrající. Vyskytuje se v listnatých a jehličnatých lesích v období října a listopadu, ale při příznivém počasí může růst i v zimních měsících. V České republice se řadí mezi ohrožené druhy¹¹.

Obrázek 3: *Psilocybe bohemica*

2.1.4 Lysohlávka moravská (*Psilocybe moravica*)

Lysohlávka moravská (znázorněna na obrázku 4) je velmi podobná lysohlávce české, na rozdíl od ní má však pestřeji zbarvený, oranžově nebo okrově hnědý klobouk s nápadně břichatými lupeny. Klobouk je na okraji slabě rýhovaný. Na třeni je často přítomná prstenovitá zóna¹¹.

Obrázek 4: *Psilocybe moravica*

2.1.5 Intoxikace houbami rodu *Psilocybe*

Hlavními toxiny hub rodu *Psilocybe* jsou indolové alkaloidy psilocybin a psilocin. Mimo nich byl v těchto houbách objeven také baeocystin a norbaeocystin, oba toxiny jsou však obvykle zastoupeny v mnohem menším množství než psilocybin. Teprve v několika málo druhích hub byl objeven ve stopovém množství aeruginascin. Všechny uvedené toxiny jsou si strukturně velice podobné a řadí se mezi deriváty tryptaminu^{9, 13, 14}.

Bylo zjištěno, že *Psilocybe semilanceata* obsahuje průměrně 0,98 % psilocybinu, 0,02 % psilocinu a 0,36 % baeocystinu v hmotnosti sušiny. Střední obsah toxinů v *Psilocybe bohemica* je 0,85 % psilocybinu, 0,02 % psilocinu a 0,04 % baeocystinu v hmotnosti sušiny. Je však třeba zdůraznit, že obsah toxinů může u stejného druhu hub rodu *Psilocybe* silně kolísat^{9, 15}.

Po požití hub je střevní sliznicí absorbováno asi 50 % celkového množství psilocybinu. Účinky se u některých konzumentů objevují už při dávce psilocybinu 3 mg podaných perorálně, dávka působící psychoaktivně u většiny konzumentů je pak 8 mg a vyšší¹⁶. Dávka 10 mg psilocybinu odpovídá přibližně 1 g sušených lysohlávek kopinatých, to je asi 15–25 středně velkých plodnic⁹.

Stav po požití hub obsahujících psilocybin se označuje jako psilocybinový syndrom. Psychotropní účinky nastávají po 30–60 minutách od požití hub, mohou se projevat zkresleným vnímáním časoprostoru, zrakovými a sluchovými halucinacemi a střídáním nálad, projevy jsou značně individuální. Mezi další příznaky intoxikace patří zrychlený tep, zvýšený krevní tlak a mydriáza. Stav intoxikace trvá obvykle 4–6 hodin, maximálně však 12 hodin, metabolity jsou vylučovány především renálně^{8, 16, 17}.

2.1.6 Zneužití jako rekreační drogy

Přestože byl psilocybin poprvé identifikován až v roce 1958 Albertem Hoffmanem, houby jej obsahující byly využívány podstatně dříve. Je známo, že domorodí obyvatelé amerického kontinentu psychoaktivní houby konzumovali při různých náboženských rituálech¹⁸.

Houby rodu *Psilocybe* jsou dodnes zneužívány jako rekreační drogy. Nižší dávky psilocybinu obvykle vyvolávají příjemné, relaxační účinky, naproti tomu vysoké dávky s větší pravděpodobností vyústí v negativní prožitek. Toto pravidlo ovšem neplatí vždy, účinky psychoaktivních látek se mohou lišit u různých konzumentů a jsou těžko předpověditelné, mohou být mimo výše dávky ovlivněny také psychickým stavem konzumenta, okolním

prostředím i kombinací s jinými drogami^{10, 18}.

Jelikož se množství psychotropních látek v jednotlivých plodnicích liší, snadno může dojít k předávkování vedoucím k nepříjemným depresním, úzkostným i život ohrožujícím stavům. Letální dávka LD₅₀ psilocybinu je vysoká, pro myš bílou činí 280 mg/kg při intravenózním podání, smrtelné intoxikace proto nejsou časté¹⁶. Zaznamenaná úmrtí po požití lysohlávek byla zapříčiněna spíše ovlivněním psychického stavu konzumenta, u některých jedinců může dojít k vyvolání sebevražedných sklonnů^{8, 10, 12}.

Užívání psilocybinu může vést k psychické závislosti, mohou se také projevovat tzv. flashbaky, kdy konzument prožívá pocity jako při intoxikaci drogou i po delší době od jejího požití⁸.

2.1.7 Využití v lékařství

V současné době jsou studovány možnosti využití hub obsahujících psilocybin jako psychofarmaka. Ukázalo se, že by mohly být využívány pro zklidnění a zmírnění bolesti u pacientů trpících tzv. Cluster headache, což je stav intenzivní specifické bolesti hlavy, kde jsou jiné možnosti léčby velmi omezené a často nedostačující¹⁸.

Dále byly v rámci medicínských výzkumů studovány pozitivní účinky psilocybinu na redukci úzkosti a stresu u onkologických pacientů a pacientů s duševními nemocemi zahrnující deprese a obsedantně-kompulzivní poruchu, nebo možnost využití psilocybinu k léčbě závislosti na alkoholu^{18, 19}.

Využití psychedelik v medicíně je ovšem kontroverzním tématem a psilocybin zůstává ve většině zemí zakázanou substancí, legalizace psilocybinu je předmětem diskusí¹⁸.

2.2 Toxiny obsažené v *Psilocybe semilanceata*

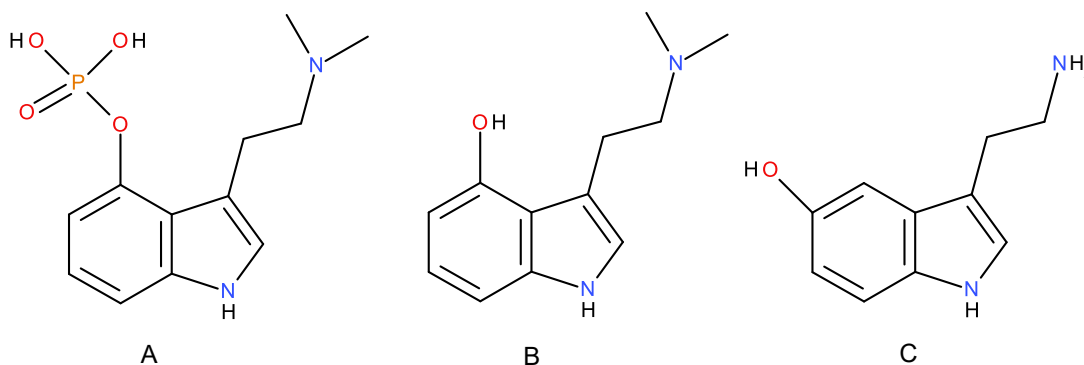
2.2.1 Psilocin a psilocybin

Psilocin a psilocybin jsou indolové alkaloidy přirozeně se vyskytující v několika druzích hub, především v rodech *Psilocybe*, *Panaeolus* a *Conocybe*, které jsou někdy označovány jako tzv. magické houby (anglicky „magic mushrooms“). Po konzumaci těchto hub je psilocybin v těle defosforylován za vzniku psilocinu, který je farmakologicky aktivní a způsobuje halucinace, poruchy myšlení a změny nálad²⁰.

Psilocybin je možné detekovat v plazmě už 20–40 minut po požití houby, psilocin

se objevuje v plazmě asi po 30 minutách. K defosforylaci psilocybinu dochází částečně už v kyselém prostředí žaludku, dále se na defosforylaci podílí alkalická fosfatasa a další nescifické esterasy ve střevech i v dalších tkáních. Psilocin prochází přes hemoencefalickou bariéru a hromadí se v mozku^{16, 19, 21}.

Struktura psilocinu je podobná struktuře neurotransmiteru serotoninu, proto se psilocin s vysokou afinitou váže a aktivuje serotoninový 5-HT_{2A} receptor, podobně jako například LSD (diethylamid lysergové kyseliny) nebo meskalin, čímž způsobuje halucinogenní účinek trvající 4 až 6 hodin. Struktura psilocybinu, psilocinu a serotoninu je znázorněna na obrázku 5 (cit. ^{16, 18, 19, 22}).



Obrázek 5: Struktura psilocybinu (A), psilocinu (B) a serotoninu (C)

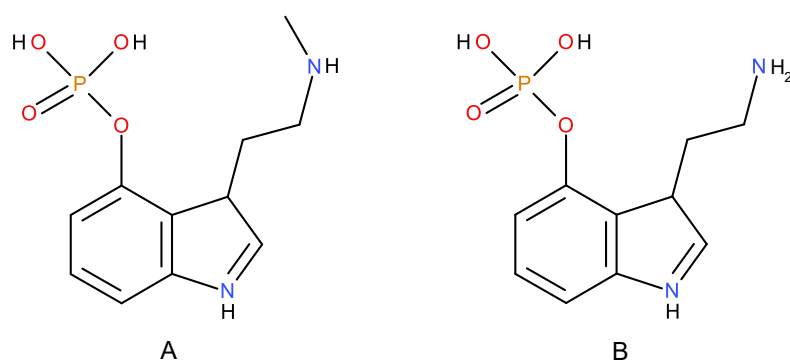
Psilocin je majoritně metabolizován na psilocin-O-glukuronid a na 4-hydroxyindol-3-acetaldehyd. 4-Hydroxyindol-3-acetaldehyd může být oxidován na 4-hydroxyindol-3-acetát, nebo redukován na 4-hydroxyindol-3-ethanol. Už 5 hodin po intoxikaci je v krevním séru až 80 % psilocinu přítomno ve formě O-glukuronidu, který je vylučován močí^{16, 19}.

Analýza psilocybinu a psilocinu v tělních tekutinách je náročná, jelikož tyto toxiny jsou velmi rychle metabolizovány a vykazují omezenou stabilitu – podléhají oxidaci na vzduchu a světlu, obzvláště pokud jsou skladovány ve formě roztoku. Také jsou termolabilní^{19, 21, 23, 24}.

Ve vzorcích krve obsahujících psilocin, které byly skladovány s přidavkem fluoridu sodného jako stabilizátoru při pokojové teplotě, byl po jednom týdnu sledován pokles analytu až o 90 %. Proto je doporučeno vzorky krve obsahující psilocin skladovat při teplotě asi 4 °C a jakmile je to možné, provést centrifugaci a sérum zmrazit^{19, 25}.

2.2.2 Baeocystin a norbaeocystin

Kromě psilocinu a psilocybinu byly v řadě hub rodu *Psilocybe*, včetně *Psilocybe semilanceata*, nalezeny v menších množstvích také tryptaminové deriváty baeocystin a norbaeocystin, které jsou strukturně velmi podobné psilocybinu, jak je vidět na obrázku 6 (cit. ^{9, 13}).



Obrázek 6: Struktura baeocystinu (A) a norbaeocystinu (B)

Baeocystin a norbaeocystin jsou substráty enzymatické syntézy psilocybinu, která je v poslední době předmětem zkoumání, jelikož roste zájem o využití psilocybinu ve farmacii a předpokládá se poptávka po jeho biotechnologické produkci²⁶.

Objevují se spekulace, že baeocystin a norbaeocystin přispívají k farmakologickým účinkům při intoxikaci houbami rodu *Psilocybe*, mohou být například zodpovědné za variabilitu účinků při těchto intoxikacích, zatím však tyto hypotézy nebyly potvrzeny²⁷.

2.3 Metody analýzy toxinů z hub

V současné době jsou podle odborné literatury hlavními metodami, využívanými k analýze toxinů v extraktech hub a v tělních tekutinách pacientů při houbových intoxikacích, kapalinová nebo plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií, případně tandemovou hmotnostní spektrometrií²⁸.

2.3.1 Extrakce

Extrakce patří ke klasickým konvenčním způsobům přípravy vzorků ke chromatografickým analýzám. Často se využívá k oddělení cílových analytů z kapalného nebo pevného vzorku, redukci interferencí matrice nebo k prekoncentraci analytů^{29, 30}.

Přímá extrakce

Převedení analytu z pevné fáze do roztoku lze provést pomocí přímé extrakce. Tuhý vzorek může být ponechán jako kompaktní matrice, nebo se před extrakcí rozmělní na malé částice a homogenizuje se, což urychlí a zefektivní extrakci. K tuhému vzorku je poté přidáno vhodné rozpouštědlo, to je zvoleno v závislosti na chemických a fyzikálních vlastnostech analytu, typu matrice a na dalším postupu zpracování extraktu. Mezi techniky využívané k usnadnění extrakce tuhá látka-kapalina patří extrakce na horizontální laboratorní třepačce či rotační třepačce, extrakce na ultrazvukové lázni za laboratorní nebo zvýšené teploty a extrakce na kontinuálních extraktorech (Soxhletův, Twisselmannův extraktor)²⁹.

Velmi populárními organickými rozpouštědly využívanými k přímé extrakci jsou methanol a acetonitril, protože mají střední polaritu a je v nich rozpustná široká škála analytů. Pokud je potřeba zvýšit polaritu extrakčního činidla, využívá se většinou směsi organické rozpouštědlo-voda, pro analyty mající kyselý nebo bazický charakter se s výhodou využívá směsi organické rozpouštědlo-puf. Naopak pro extrakci nepolárních analytů jsou vhodná nepolární rozpouštědla, jako například hexan, cyklohexan, benzen nebo chloroform²⁹.

V současné době rostou nároky na zohlednění vlivu extrakčního činidla na životní prostředí. Doporučuje se upřednostňovat rozpouštědla, která jsou neškodná pro životní prostředí, nebo alespoň mající co nejnižší toxicitu, zároveň je snaha co nejvíce minimalizovat množství využívaného extrakčního činidla. V úvahu by měla být brána i energetická náročnost zvoleného způsobu extrakce³⁰.

Hluboce eutektická rozpouštědla

Mezi nová, šetrnější extrakční činidla patří hluboce eutektická rozpouštědla (deep eutectic solvents, DES), která tvoří nanostruktury a jsou řazena mezi iontové kapaliny. Skládají se ze dvou složek, které spolu interagují prostřednictvím vodíkových vazeb. Akceptorem vodíkové vazby zde může být například kvarterní amoniová sůl. Donorem vodíkové vazby je typicky organická kyselina, aminokyselina nebo cukr^{30, 31}.

Hluboce eutektická rozpouštědla často vytvářejí jemné kapičky reverzních micel nemísitelných s vodou, do nichž lze extrahovat analyty. Oddělení koacervátu z roztoku může být urychleno centrifugací³¹.

Největšími výhodami DES je snadná příprava z přírodních sloučenin, které jsou ekonomicky dostupné a šetrné k životnímu prostředí, a možnost přizpůsobení DES pro konkrétní aplikaci. Upravením poměru donoru a akceptoru vodíkové vazby lze docílit buď hydrofobního, nebo hydrofilního charakteru rozpouštědla. Hluboce eutektická rozpouštědla se dají využít pro extrakce biologicky aktivních sloučenin z rostlinných a živočišných materiálů^{30–32}.

Nevýhodou DES je obecně jejich vysoká viskozita a vysoké povrchové napětí v porovnání s většinou konvenčních rozpouštědel. Tyto faktory komplikují kombinaci hluboce eutektických rozpouštědel s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií, problémem v chromatografii je také přítomnost nečistot a silné interakce DES se stacionární fází, které mohou poškodit chromatografickou kolonu. Výše zmíněné nežádoucí vlastnosti lze upravit například volbou složek a jejich poměru při přípravě DES, přidáním vody, což ovšem může způsobit oslabení vodíkových vazeb mezi složkami DES, nebo změnou teploty. Platí, že se zvyšující se teplotou klesá viskozita^{32,33}.

2.3.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (liquid chromatography, LC) je analytická separační metoda založená na distribuci analytů mezi kapalnou mobilní fází (MF, eluent) a stacionární fází (SF, sorbent)³⁴.

Nejstarší formou kapalinové chromatografie je kolonová chromatografie, kterou poprvé popsal ruský botanik M. S. Cvět v roce 1903. V tomto uspořádání je vzorek aplikován na kolonu obsahující stacionární fází a prostřednictvím toku mobilní fáze je unášen kolonou. Analyty mající rozdílnou afinitu ke stacionární fází jsou v koloně různou dobu zadržovány, díky tomu se od sebe jednotlivé složky vzorku oddělují a v různých časech jsou eluovány ven z kolony^{34,35}.

Původně se mobilní fáze pohybovala kolonou pouze vlivem gravitace, postupně se ale začalo využívat moderní instrumentace a tok mobilní fáze zajistila mechanická pumpa, toto nové, účinnější uspořádání se od 80. let 20. století začalo označovat jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography, HPLC)³⁵.

Eluce může být prováděna isokraticky nebo s gradientem. Při isokratické eluci je v průběhu separace složení mobilní fáze konstantní. Použije-li se gradientová eluce, pak se v průběhu separace mění složení mobilní fáze obvykle za účelem lepšího rozlišení nebo zkrácení doby analýzy³⁶.

Systémy kapalinové chromatografie

Pokud má stacionární fáze polární charakter a mobilní fáze nepolární charakter, jedná se o separaci s normálními fázemi (normal phase HPLC, NP-HPLC). V případě, že je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární, mluvíme o chromatografii s reverzními fázemi (reversed phase HPLC, RP-HPLC), při níž se v koloně nejvíce zadržují analyty s nízkou polaritou. Principem zadržování analytů v systému RP-HPLC jsou nespecifické mezimolekulové interakce analytu a adsorbentu realizované slabými disperzními silami³⁴.

Mobilní fáze v RP-HPLC se typicky skládá z vody a methanolu, acetonitrilu nebo tetrahydrofuranu, stacionární fázi tvoří zpravidla uhlovodíky chemicky vázané na inertním nosiči, obvykle silikagelu někdy doplněného o polystyren-divinylbenzenový kopolymer, který zajišťuje větší chemickou stabilitu. Jednou z nejčastěji používaných stacionárních fází v RP-HPLC je oktadecylsilan³⁵⁻³⁷.

Chromatografie s reverzními fázemi v současné době převládá nad chromatografií s normálními fázemi, jelikož je využitelná pro širší rozmezí vzorků, eluční pořadí lze snadno predikovat na základně hydrofobnosti analytů, mobilní fáze jsou méně nákladné a bezpečnější pro práci a stacionární fáze jsou dostupné ve vysoké kvalitě^{36, 37}.

Hydrofilní interakční chromatografie (hydrophilic interaction chromatography, HILIC), která byla poprvé popsána A.J. Alpertem v roce 1990, je jedním z typů kapalinových chromatografických systémů. V tomto uspořádání analyty interagují s hydrofilní stacionární fází a eluce je prováděna binární mobilní fází, která se skládá z vodné složky a vysokého podílu organické složky. V současné době je mechanismus HILIC separace objasňován principem rozdělování analytů mezi hydrofobní část mobilní fáze a silně hydrofilní vrstvu vody imobilizovanou na povrchu stacionární fáze. Mohou se zde ale uplatňovat i iontové a hydrofobní interakce. Retence se zvyšuje s polaritou analytu a snižuje se zvýšením polarity mobilní fáze. K ovlivnění retence se do mobilní fáze velmi často přidává vhodný pufr³⁴.

Mobilní fáze v HILIC systému se typicky skládá z vodné složky, jejíž podíl by měl být alespoň 2,5 obj. %, a organického modifikátoru, kterým je nejčastěji acetonitril s obsahem

více než 50 obj. %. Mezi používanými stacionárními fázemi převažuje silikagel a modifikovaný silikagel, navázanou funkční skupinou může být např. aminopropylová, amidová nebo zwitteriontová. Zwitteriontová (amfoterní) funkční skupina, jako je např. sulfobetain, obsahuje aniontovou i kationtovou skupinu poskytující elektrostatické interakce, chromatografie na tomto systému se pak označuje ZIC-HILIC^{34, 38}.

Hybridní stacionární fáze obsahují kombinaci organického a anorganického materiálu a vykazují oproti čistě silikagelovým stacionárním fázím vyšší chemickou stabilitu při vysokém pH a zvýšené teplotě. Hybridní stacionární fáze s ethylenovými můstky (ethylene-bridged hybrid, BEH) je tvořena částicemi, kde jsou mezi silanolovými skupinami přítomné ethylenové můstky, tím pádem se sníží počet povrchových silanolů a tedy i retence způsobená interakcemi s těmito skupinami³⁹.

Způsoby detekce v kapalinové chromatografii

Mezi využívané detektory v HPLC patří detektor UV/VIS, fluorescenční detektor, elektrochemický detektor, vodivostní detektor, detektor radioaktivity, chemiluminiscenční detektor, chirální detektor, refraktometrický detektor, detektor ELSD (evaporative light scattering detector) a detektor CORONA (corona charged aerosol detector). K detekci lze využít i spojení HPLC s jinou analytickou metodou, jako je například hmotnostní spektrometrie, infračervená spektrometrie nebo nukleární magnetická rezonance⁴⁰.

Detektor, který má být využit ke kvantitativní analýze, je volen tak, aby poskytoval výstupní elektrický signál proporcionální k množství analytu přítomného v detektoru v danou chvíli³⁷.

2.3.3 UV/VIS detekce

Spektrofotometrický detektor v ultrafialové a viditelné oblasti světla (190–800 nm) je nejrozšířenějším detektorem používaným v HPLC. Principem detekce je rozdílná absorpce světla analytem a rozpouštědlem v UV/VIS oblasti, měřenou veličinou je absorbance⁴¹.

Významnými skupinami chromoforů, které způsobují absorpci světla v UV/VIS oblasti, jsou karbonyl, azo skupina, aromatická jádra a konjugované dvojné vazby. Pro úspěšnou detekci je žádoucí, aby analyt vykazoval co nejvyšší absorbanci a rozpouštědlo naopak co nejnižší absorbanci. Vhodnými rozpouštědly, které v UV/VIS oblasti vykazují pouze nízkou absorbanci, jsou např. voda, methanol a acetonitril^{40, 41}.

Rozlišujeme tři typy UV/VIS detektorů: s fixní vlnovou délkou, s nastavitelnou vlnovou délkou a detektory s diodovým polem. Detektory s diodovým polem (photodiode array detectors, PDA) využívají simultánní detekce intenzity světla všech vlnových délek ve zvoleném rozmezí a dokáží zaznamenat celé UV/VIS absorpční spektrum^{40, 42}.

Jedná se o nedestruktivní způsob detekce, za UV/VIS detektor proto lze zapojit další detekční zařízení, jako např. hmotnostní spektrometr.

2.3.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry, MS) je analytická metoda založená na separaci iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) a slouží ke kvalitativní i kvantitativní analýze. Za zakladatele hmotnostní spektrometrie se považuje Sir J. J. Thomson, který v roce 1912 sestrojil první hmotnostní spektrometr^{43–45}.

Prvním krokem analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie je produkce iontů v plynné fázi, vzniklých ze zkoumané sloučeniny ionizací. Mezi způsoby ionizace v MS patří elektronová ionizace (electron ionization, EI), chemická ionizace (chemical ionization, CI), ionizace elektrickým polem (field ionization, FI), desorpce elektrickým polem (field desorption, FD), ostřelování vzorků rychlými atomy (fast atom bombardment, FAB), ionizace laserem za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI), ionizace elektrosprejem (electrospray ionization, ESI) nebo termosprejem (thermospray ionization, TSI) a mnoho dalších⁴⁴.

Následně jsou ionty separovány v hmotnostním analyzátoru, ve kterém dochází k interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Rozlišujeme analyzátory skenující, průletové a iontové pasti⁴⁵.

Skenující analyzátory kontinuálně v čase separují ionty podle jejich poměru m/z , patří mezi ně kvadrupólové analyzátory a sektorové přístroje. Průletové analyzátory využívají současné transmise všech nabitých částic do průletové trubice, kde se ionty rozdělují na základě rozdílné doby letu, odtud také pochází anglické označení „time of flight (TOF)“ analyzátory. Poslední skupina analyzátorů zadržuje ionty v cele či pasti pomocí napětí na elektrodách a následně je analyzuje, patří sem iontově cyklotronová rezonance nebo elektrostatická iontová past (označovaná také „orbitrap“)⁴⁵.

Princip detekce v hmotnostním spektrometru je obvykle založen na přímém měření elektrického proudu, který vzniká při srážce iontu s dynodou a následně je zesilován pomocí násobičů⁴⁵.

Ionizace elektrosprejem

Ionizaci elektrosprejem řadíme mezi měkké ionizační techniky, u nichž vznikají především protonované $[M+H]^+$ či deprotonované $[M-H]^-$ molekuly analytu, ale k rozsáhlejší fragmentaci nedochází. Tyto techniky umožňují určit molekulovou hmotnost analytu, ale neposkytují jeho strukturní informaci³⁴.

K ionizaci elektrosprejem dochází aplikací silného elektrického pole (napětí 3–6 kV) na kapalinu protékající kovovou kapilárou za atmosférického tlaku. Na výstupu z kapiláry kapalina tvoří vysoce nabitě kapičky. Plyn proudící koaxiálně vzhledem ke kapiláře zužuje disperzi kapiček. Kapičky procházejí zahřátým inertním plynem (např. dusíkem), dochází k odpařování rozpouštědla a zvyšování jejich povrchového náboje. Coulombické odpuzování způsobí explozi kapičky a její zmenšování, vzniklé ionty jsou poté uvolněny do plynné fáze a směřují do analyzátoru^{44, 45}.

Kvadrupólové analyzátory

Pravděpodobně nejvíce rozšířeným hmotnostním analyzátozem je v současnosti kvadrupól, který je tvořen čtyřmi paralelními tyčemi. Na tyče je vloženo stejnosměrné napětí a oscilující radiofrekvenční střídavé napětí, protilehlé elektrody mají vždy stejnou polaritu. Ionty jsou přivedeny do kvadrupólu pod nízkým napětím a začnou oscilovat mezi tyčemi. Při dané kombinaci velikostí stejnosměrného a střídavého napětí se ionty o určitém poměru m/z pohybují po stabilní trajektorii směrem k detektoru, zatímco ostatní ionty s nestabilní trajektorií jsou vychýleny a na detektor nedopadnou^{45, 46}.

Pracuje-li kvadrupól ve skenovacím módu, kontinuálně se mění elektrické pole a v krátkém časovém úseku se proměří všechny hodnoty m/z . Za účelem zvýšení citlivosti byl vyvinut SIM (single ion monitoring) mód, při němž se nastaví takové elektrické pole kvadrupólu, aby k detektoru procházely pouze ionty o zvoleném m/z (cit. ⁴⁵).

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) v prostoru, spočívající ve spojení dvou hmotnostních analyzátorů, umožňuje dosáhnout vysoké citlivosti a specifity. Nejběžnějším uspořádáním tandemové hmotnostní spektrometrie je trojitý kvadrupól^{34, 45, 46}.

První kvadrupól zde generuje prekurzorové ionty, druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela, kde dochází ke srážkám prekurzorových iontů, urychlených elektrickým polem, s molekulami nebo atomy kolizního plynu (např. dusík, argon). Vlivem fragmentace vznikají specifické produktové ionty, které vstupují do třetího kvadrupólu. Tento princip vzniku fragmentovaných iontů se označuje jako kolizně indukovaná disociace (collision-induced dissociation, CID)⁴⁵.

2.3.5 Metody extrakce psilocinu a psilocybinu z biologického materiálu

Mezi metodami extrakce psilocinu a psilocybinu z hub rodu *Psilocybe* převažuje v literatuře přímá extrakce methanolem, někdy s využitím ultrazvukové lázně. Doposud nebyla v dostupné literatuře nalezena žádná studie zabývající se extrakcí těchto toxinů pomocí DES (cit. ^{13, 47–51}).

2.3.6 Metody identifikace a stanovení psilocinu a psilocybinu

K identifikaci a stanovení psilocinu, psilocybinu a jim podobných toxinů se v literatuře nejčastěji využívá metoda HPLC-MS/MS. Výhodou této metody je vysoká přesnost, opakovatelnost, selektivita, robustnost i možnost dosáhnout velmi nízkých detekčních limitů. Zároveň nevyžaduje derivatizaci analytů. Vhodným módem HPLC pro tyto analýzy je RP-HPLC nebo HILIC^{13, 14, 25, 28, 47, 52, 53}.

Lze využít i kombinaci HPLC s jinými způsoby detekce, jako je UV detekce⁴⁸, fluorimetrická detekce⁵⁰, chemiluminiscence⁵¹ nebo elektrochemická detekce^{54, 55}.

Byla popsána také analýza tenkovrstvou chromatografií (thin layer chromatography, TLC)^{49, 55} nebo plynovou chromatografií v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (GC-MS)^{55, 56}. Tenkovrstvá chromatografie je vhodná spíše k identifikaci toxinů než ke stanovení jejich obsahu ve vzorku. Nevýhodou využití plynové chromatografie ke stanovení tryptaminových toxinů je nutnost provést před samotnou analýzou nejprve derivatizaci (např. trimethylsilylaci), jelikož jsou tyto toxiny málo těkavé a termolabilní^{55, 56}.

Kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis, CZE) představuje další metodu využitelnou ke stanovení tryptaminových toxinů. Ve studii Pedersen-Bjergaarda et al.⁴⁹ se tato metoda ukázala být vhodnou pro stanovení psilocybinu a baecocystinu, ale kvůli alkalickým podmínkám při analýze došlo k degradaci psilocinu, který tím pádem nemohl být stanoven.

Metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je užitečná k detekci ilegálních drog mimo laboratoř, Yamaguchi et al.⁵⁷ ve své studii připravili monoklonální protilátky reaktivní vůči psilocinu, které by mohly být v budoucnu využívány pro imunochromatografické kity schopné detekovat psilocin.

2.4 Vyhodnocení chromatografických analýz

Aby bylo možné chromatografické analýzy správně vyhodnotit, je potřeba dosáhnout co nejefektivnější separace. Mezi základní parametry charakterizující separaci patří retenční faktor, selektivita a rozlišení³⁶.

Retenční faktor k určuje míru retence dělených látek, tedy kolikrát více času stráví analyt ve stacionární fázi než v mobilní fázi. Vztah pro výpočet retenčního faktoru uvádí rovnice č. 1, kde t_R je retenční čas analytu (doba od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky) a t_M je mrtvý čas (retenční čas analytu, který se na koloně nezadržuje). Ideální jsou separace, kde k nabývá hodnot od jedné do pěti³⁴⁻³⁶.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

Selektivita α určuje, jak dobře budou na koloně vzájemně odděleny dva analyty. Selektivita je dána poměrem retenčních faktorů obou analytů k_2 a k_1 , jak je uvedeno v rovnici č. 2. Pokud je α rovna jedné, eluční křivky analytů se překrývají a analyty nejsou odděleny³⁴⁻³⁶.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

Rozlišení $R_{1,2}$ je kvantitativní mírou schopnosti kolony separovat dva analyty. Závisí na retenčních časech obou analytů ($t_{R,1}$ a $t_{R,2}$) a na šířce jejich píků při základně (w_1 a w_2), vztah pro výpočet rozlišení udává rovnice č. 3. Vyhovující separace lze dosáhnout, pokud $R_{1,2}$ nabývá hodnoty rovné nebo větší než 1,5 (cit. ³⁴⁻³⁶).

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{R,2} - t_{R,1})}{w_1 + w_2} \quad (3)$$

2.4.1 Kvalitativní hodnocení

Identifikaci látek v HPLC je možné provést porovnáním retenčního času analytu se známým standardem. Při detekci pomocí hmotnostní spektrometrie lze ke kvalitativnímu hodnocení využít také informace o molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentech analytu. Detektory s diodovým polem zase umožňují identifikaci porovnáním spekter neznámých vzorků se spektry standardních látek měřených při stejných chromatografických podmínkách, nebo s knihovnou spekter^{29, 34, 35}.

2.4.2 Kvantitativní hodnocení

Pokud je použita analytická metoda lineární, pak intenzita signálu R generovaného při průchodu analytu celou detektorem je v určitém rozmezí lineárně závislá na koncentraci analytu c . Lineární úsek závislosti $\log R$ na $\log c$ se nazývá lineární dynamický rozsah detektoru a lze jej využít ke kvantitativnímu hodnocení chromatografické analýzy^{34, 37}.

Ke stanovení obsahu sledovaného analytu ve vzorku se využívá plocha píku A nebo výška píku h . Vyhodnocení dat v HPLC má relativní charakter, proto je nutný vztah mezi plochou nebo výškou píku a koncentrací stanovovaného analytu určit empiricky pomocí standardů. Pro výpočet koncentrace analytu pak lze použít některou z následujících metod: metoda vnějšího standardu (metoda kalibrační křivky), metoda přídavku standardu, metoda vnitřního standardu, metoda vnitřní normalizace^{29, 34, 35}.

Metoda vnitřního standardu

Principem metody vnitřního standardu je přidavek roztoku vnitřního standardu (internal standard, IS) jak k roztoku standardu, tak k roztoku vzorku. Ideální je přidavek stejného množství vnitřního standardu do všech analyzovaných roztoků. Vnitřní standard by měl být eluován v blízkosti stanovované látky a mít podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, koncentrace roztoku vnitřního standardu musí být známa²⁹.

Po proměření série standardních roztoků o různých koncentracích analytu, ke kterým je přidán vždy stejný objem vnitřního standardu o jedné koncentraci, lze sestavit kalibrační křivku závislosti poměru ploch píku analytu A a vnitřního standardu A_{IS} na koncentraci analytu c . Ke vzorku o neznámé koncentraci analytu je poté přidán stejný objem téhož roztoku vnitřního standardu a z regresní rovnice kalibrační křivky je dopočítána koncentrace analytu ve vzorku²⁹.

Tato metoda eliminuje vliv změny pracovních podmínek při analýzách, jelikož vnitřní standard je touto změnou podmínek ovlivněn stejně jako stanovovaná látka²⁹.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (limit of detection, LOD) odpovídá nejnižší koncentraci analytu, která poskytuje analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti (limit of quantification, LOQ) odpovídá nejnižší koncentraci analytu, kterou lze stanovit s dostatečnou přesností a správností²⁹.

Jedním z možných způsobů výpočtu LOD a LOQ je výpočet za využití směrnice kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci analytu b a hodnoty šumu základní linie chromatogramu, jak je uvedeno v rovnici č. 4 a 5 (cit. ²⁹).

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot \text{šum}}{b} \quad (4)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot \text{šum}}{b} \quad (5)$$

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

K přípravě mobilních fází pro chromatografické analýzy byl použit acetonitril ($\geq 99,9\%$, LC-MS Chromasolv, Honeywell Riedel-de Haën, Německo), methanol ($\geq 99,9\%$, LC-MS Chromasolv, Honeywell Riedel-de Haën, Německo), mravenčí kyselina ($\sim 98\%$ p.a., Lach-Ner, Česká republika), octan amonný ($\geq 98,5\%$ p.a., Penta, Česká republika) a deionizovaná voda.

K přípravě standardních roztoků studovaných toxinů byl použit roztok psilocinu (1,0 mg/ml v acetonitrilu, certifikovaný referenční materiál, Supelco Analytical, Sigma-Aldrich, USA), psilocinu-D₁₀ (100 $\mu\text{g/ml}$ v acetonitrilu, certifikovaný referenční materiál, Supelco Analytical, Sigma-Aldrich, USA) a psilocybinu (1,0 mg/ml ve směsi acetonitril:voda v poměru 1:1 (v/v), certifikovaný referenční materiál, Supelco Analytical, Sigma-Aldrich, USA). Zásobní roztoky standardů byly skladovány při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

K přípravě reálných vzorků byly použity vysušené plodnice lysohlávky kopinaté (znázorněné na obrázku 7) nasbírané v lokalitě Borová Lada (Národní park Šumava) v listopadu 2020. Extrakce sledovaných toxinů byly provedeny methanolem ($\geq 99,9\%$, LC-MS Chromasolv, Honeywell Riedel-de Haën, Německo) a hluboce eutektickými rozpouštědly, které byly dodány RNDr. Tomášem Hložkem, Ph.D., postup jejich přípravy je uveden v kapitole 3.3. K ředění vzorků byla použita deionizovaná voda, acetonitril a methanol, jejichž specifikace jsou uvedeny výše.



Obrázek 7: Vysušené plodnice *Psilocybe semilanceata*

3.2 Instrumentace

Pro navážku octanu amonného, potřebného pro přípravu mobilních fází, byly použity předvážky Highland HCB 123 (Adam Equipment, Velká Británie). Plodnice analyzovaných hub byly zváženy na analytických vahách APX-100 (Denver Instrument, Německo).

Hodnoty pH vodných složek mobilních fází byly upravovány pomocí pH metru 3540 Combined pH & Conductivity (Jenway, Velká Británie). Ke kalibraci sloužil roztok pufru o pH 4,0 obsahující citronovou kyselinu, hydroxid sodný a chlorid sodný (Honeywell Fluka, Německo) a roztok pufru o pH 7,0 obsahující hydrogenfosforečnan sodný a dihydrogenfosforečnan draselný (Honeywell Fluka, Německo).

Centrifugace byla prováděna pomocí minicentrifugy Gusto (Carl Roth, Německo).

Ke všem chromatografickým analýzám byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) složený z vysokotlaké pumpy (Agilent 1290 Infinity), termostátovaného automatického dávkovače (Agilent 1290 Infinity), kolonového termostatu (Agilent 1290 Infinity) a detektoru diodového pole (1290 Infinity).

K detekci byl mimo detektoru diodového pole využit i hmotnostní spektrometr Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS System (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s ionizací elektrosprejem a možností využít technologii Agilent Jet Stream, která zlepšuje desolvataci iontů a citlivost systému.

Chromatografické analýzy byly provedeny pomocí následujících kolon: Discovery HS C18 (150 × 4,6 mm, 3 μm, Supelco Analytical, Sigma-Aldrich), Kinetex Phenyl-Hexyl (100 × 2,1 mm, 1,7 μm, Phenomenex), Kinetex C8 (100 × 2,1 mm, 1,7 μm, Phenomenex), SeQuant ZIC-cHILIC (100 × 2,1 mm, 3 μm, Supelco Analytical, Sigma-Aldrich), Acquity UPLC BEH HILIC (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm, Waters).

Naměřená data byla vyhodnocena v počítačovém programu Agilent MassHunter Workstation Software (Agilent Technologies) a v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation).

3.3 Přímá extrakce toxinů lysohlávky kopinaté

Byly provedeny dvě extrakce methanolem a dvě extrakce pomocí hluboce eutektických rozpouštědel.

K první extrakci methanolem byla vybraná plodnice lysohlávky kopinaté rozdělena na klobouk a třeň. Klobouk byl rozdělen na dvě části o hmotnostech 17,8 mg a 15,7 mg, obě části byly extrahovány zvlášť pomocí 1 ml methanolu. Třeň měl hmotnost 27,4 mg a byl rozdělen na čtyři části, které byly dohromady extrahovány 1 ml methanolu. Takto připravené extrakty v Eppendorfových zkumavkách byly uzavřeny a uchovány v lednici při teplotě 5 °C. Po 1, 20 a 91 hodinách byly odebrány z každé zkumavky dva alikvoty o objemu 100 μl k analýze pro dva různé způsoby ředění. Každý odebraný alikvot extraktu byl nahrazen odpovídajícím množstvím methanolu.

Druhá extrakce methanolem byla provedena s o něco menší plodnicí lysohlávky kopinaté. Klobouk vážil 22,5 mg a v celku byl extrahován 1 ml methanolu. Extrakt byl opět uchován uzavřený při teplotě 5 °C. Po 20, 40, 60 a 90 minutách byl z extraktu odebrán alikvot 100 μl pro analýzu, ředění bylo provedeno pouze vodou. Každý odebraný alikvot extraktu byl nahrazen odpovídajícím množstvím methanolu.

Extrakce pomocí DES byla provedena ve spolupráci s RNDr. Tomášem Hložkem, Ph.D. z Ústavu soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN Praha, který připravil roztoky DES a provedl extrakce.

První roztok DES byl připraven smísením 0,7 g cholinchloridu s 550 μl ethylenglykolu ve 4ml vialce, tato směs se nechala temperovat při 85 °C 1 hodinu do vzniku čiré kapaliny. Objem 300 μl takto připravené směsi byl využit k extrakci části klobouku lysohlávky kopinaté o hmotnosti 8,5 mg. Druhý roztok DES byl připraven smísením 0,7 g cholinchloridu s 900 μl mléčné kyseliny ve 4ml vialce, směs byla opět temperována při 85 °C 1 hodinu. Objem 300 μl druhého roztoku DES byl využit k extrakci části klobouku lysohlávky kopinaté o hmotnosti 12,6 mg. Klobouk byl před extrahováním DES homogenizován, extrakce trvala 1 hodinu.

3.4 Úprava pH vodné složky mobilní fáze

Úpravy vodné složky mobilní fáze na požadované pH bylo docíleno přidavkem mravenčí kyseliny.

3.5 Příprava a uchování vzorků pro HPLC analýzy

3.5.1 Příprava standardních roztoků a roztoků pro kalibraci

Pro experimenty zaměřené na optimalizaci detekce tandemovou hmotnostní spektrometrií byl připraven standardní roztok psilocinu o koncentraci 0,1 mg/ml v acetonitrilu a standardní roztok psilocybinu o koncentraci 0,1 mg/ml ve směsi acetonitril:voda v poměru 1:1 (v/v).

Dále byl připraven směsný roztok standardů psilocinu a psilocybinu o koncentraci obou analytů 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve směsi acetonitril:voda v poměru 1:1 (v/v), který byl použit k experimentům pro optimalizaci analytické metody HPLC-MS/MS.

Pro kvantitativní analýzu byly připraveny dvě řady kalibračních roztoků. První kalibrační řada roztoků byla připravena ze směsného roztoku standardů psilocinu a psilocybinu v deionizované vodě, kde oba analyty měly koncentraci 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ředění směsného roztoku bylo provedeno deionizovanou vodou. Kalibrační řada obsahovala roztoky o koncentracích analytů 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 a 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$, které obsahovaly přídavek interního standardu psilocinu-D₁₀ o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Druhá kalibrační řada roztoků byla připravena ze směsného roztoku standardů psilocinu a psilocybinu ve směsi acetonitril:voda v poměru 1:1 (v/v), kde oba analyty měly koncentraci 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ředění směsného roztoku bylo provedeno směsí acetonitril:voda v poměru 1:1 (v/v). Kalibrační řada obsahovala roztoky o koncentracích analytů 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 25; 50 a 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$, které obsahovaly přídavek interního standardu psilocinu-D₁₀

o koncentraci 2,5 µg/ml.

3.5.2 Příprava reálných vzorků

Z prvních dvou methanolických extraktů získaných přímou extrakcí klobouku nebo třeně lysohlávky kopinaté byl vždy po stanovené době odebrán jeden nebo dva alikvoty 100 µl pro analýzu. K takto odebraným alikvotům extraktů byl přidán interní standard psilocin-D₁₀ a byly dvakrát zředěny. Při první extrakci byly sledovány dva různé způsoby ředění, a to buď směsí acetonitril:voda v poměru 1:1 (v/v), anebo jen vodou, proto se odebíraly dva alikvoty. Při druhé extrakci bylo zvoleno pouze ředění vodou.

Extraktů DES byly centrifugovány při 9 500 rpm po dobu 5 minut. Z obou extraktů bylo odebráno 10 µl supernatantu, který byl zředěn 50× methanolem, a dalších 10 µl supernatantu, který byl zředěn 25× methanolem. K methanolem zředěným extraktům byl poté přidán interní standard psilocin-D₁₀ a byly dvakrát zředěny vodou.

Koncentrace interního standardu ve všech reálných vzorcích určených k analýze byla 2,5 µg/ml.

3.5.3 Uchování standardních roztoků a reálných vzorků

Jelikož jsou psilocin a psilocybin v roztoku na vzduchu a světle nestabilní a jsou termolabilní, byly všechny vzorky standardů i extraktů těchto toxinů analyzovány, pokud možno, co nejdříve od jejich přípravy a případně byly skladovány uzavřené při teplotě 5 °C a bez přístupu světla.

3.6 Kvalitativní hodnocení analýz

Kvalitativní hodnocení analýz bylo provedeno porovnáním retenčních časů analytů s retenčními časy standardů a sledováním specifických fragmentů analytů pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie v režimu pozitivních iontů. Podmínky fragmentace i sledované prekurzorové a produktové ionty byly zvoleny na základě optimalizace, která je popsána v kapitole 4.1.

3.7 Kvantitativní hodnocení analýz

Ke kvantitativnímu hodnocení analýz byla využita metoda vnitřního standardu, kde jako vnitřní standard sloužil psilocin-D₁₀. Za využití série směsných standardních kalibračních roztoků psilocinu a psilocybinu byla sestrojena kalibrační závislost poměru plochy píku analytu a interního standardu na hmotnostní koncentraci analytu. Pro vyjádření hmotnostního obsahu toxinů v analyzovaných plodnicích lysohlávky kopinaté byly zjištěné hmotnosti toxinů vztaženy na gram navážky houbového materiálu.

Hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti byly určeny dvěma způsoby. Jedním způsobem bylo experimentální stanovení, kdy vzorky byly ředěny tak dlouho, dokud na chromatogramu už nebyl zaznamenán jasně odlišitelný pík analytu od šumu. Druhým způsobem bylo určení LOD a LOQ pomocí výpočtu z hodnoty šumu základní linie chromatogramu a směrnice rovnice kalibrační závislosti poměru výšky píku analytu a interního standardu na hmotnostní koncentraci analytu.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace tandemové hmotnostní detekce

Experimenty zaměřené na optimalizaci tandemové hmotnostní detekce byly provedeny za využití standardního roztoku psilocinu a standardního roztoku psilocybinu vždy o koncentraci 0,1 mg/ml, dávkován byl 1 μ l těchto roztoků. Hmotnostní analyzátor byl nastaven pro práci v režimu pozitivních iontů (ESI+ mód), výchozí hodnota napětí na fragmentoru byla 100 V, výchozí čas přechodu (dwell time) činil 200 ms. Pro všechny experimenty bylo napětí na sprejovací kapiláře +5 500 V, teplota desolvatačního plynu (dusíku) byla 350 °C, průtok desolvatačního plynu 10 l/min a tlak nebulizéru 55 psi.

Ve skenovacím režimu hmotnostního spektrometru byly nalezeny optimální prekurzorové ionty obou analytů. Rozmezí detekovaných hmot m/z bylo nastaveno na hodnotu 100 až 1 000, u psilocybinu byl identifikován ion s poměrem m/z 285 jako ion s nejvyšší intenzitou poskytovaného signálu, u psilocinu to byl ion s m/z 205, tyto zvolené ionty dále sloužily jako prekurzorové ionty fragmentace. Oba prekurzorové ionty vznikly z příslušného analytu přijetím protonu H^+ .

Následně bylo pro zvolený prekurzorový ion v režimu SIM optimalizováno napětí na fragmentoru a v režimu „product ion“ optimalizována kolizní energie. Produktový ion byl zvolen jako ion s nejvyšší intenzitou signálu, vznikající fragmentací prekurzorového iontu při optimálním napětí na fragmentoru a kolizní energii.

Při měření prekurzorového iontu psilocybinu bylo vyzkoušeno napětí na fragmentoru 60, 100 a 120 V. Nejvyšší intenzita prekurzorového iontu byla naměřena při napětí 100 V. Při měření prekurzorového iontu psilocinu bylo proměřeno napětí na fragmentoru 35, 50 a 100 V, optimální hodnota napětí na fragmentoru byla 50 V.

Při optimalizaci kolizní energie byly měřené hodnoty kolizních energií zvyšovány, dokud se snižovala intenzita příslušného prekurzorového iontu. U psilocybinu byly proměřeny hodnoty kolizní energie 5, 15, 20, 25 a 30 V. Nejvýznamnější produktový ion s poměrem m/z 205 měl nejvyšší intenzitu signálu při kolizní energii 15 V, z prekurzorového iontu pravděpodobně vznikl odštěpením neutrální fosfátové skupiny HPO_3 (cit. ⁵⁸). U psilocinu byly proměřeny hodnoty kolizní energie 5, 15 a 20 V. Nejvýznamnější produktový ion s poměrem m/z 58 měl nejvyšší intenzitu signálu při kolizní energii 15 V, z prekurzorového iontu vznikl složitější fragmentací.

U obou analytů byly také proměřeny tři různé časy přechodu: 200, 300 a 400 ms, nicméně jejich změnou nebyla hmotnostní detekce ovlivněna, k dalším analýzám byl proto ponechán výchozí čas přechodu 200 ms.

Pro interní standard psilocin-D₁₀ byly zvolené parametry pro hmotnostní detekci určeny na základě parametrů psilocinu, pouze byla zohledněna vyšší hmota interního standardu, přechod mezi prekurzorovým iontem a produktovým iontem byl dohledán v literatuře²⁰. Prekurzorový ion pro psilocin-D₁₀ měl hodnotu m/z 215 a produktový ion 66. Napětí na fragmentoru činilo 50 V, kolizní energie měla hodnotu 15 V. Optimalizované podmínky tandemové hmotnostní detekce pro psilocin, psilocin-D₁₀ a psilocybin jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Optimalizované podmínky MS/MS detekce, zvolené prekurzorové a produktové ionty pro sledované analyty

Analyt	Prekurzorový ion [m/z]	Produktový ion [m/z]	Napětí na fragmentoru [V]	Kolizní energie [V]
psilocin	205	58	50	15
psilocin-D ₁₀	215	66	50	15
psilocybin	285	205	100	15

4.2 Výběr chromatografického systému

Za účelem optimalizace separace studovaných toxinů byla při různých separačních podmínkách prováděna isokratická HPLC-MS/MS analýza směsného roztoku standardů psilocinu a psilocybinu, kde oba analyty měly koncentraci 5 µg/ml. Dávkováno bylo vždy 10 µl tohoto roztoku s výjimkou BEH-HILIC separací, kdy byla v možnostech hmotnostního spektrometru aktivována technologie Agilent Jet Stream a jako optimální dávkovaný objem byl zvolen objem 5 µl. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3.6, vhodným módem kapalinové chromatografie k separaci psilocinu a psilocybinu je RP-HPLC nebo HILIC. V rámci této bakalářské práce byly provedeny analýzy na pěti chromatografických kolonách. RP-HPLC separace byla sledována na stacionární fázi s chemicky vázanou oktadecylovou (C18), oktylovou (C8) a fenylhexylovou skupinou. HILIC separace byla sledována na zwitteriontové

ZIC-cHILIC a hybridní BEH-HILIC koloně.

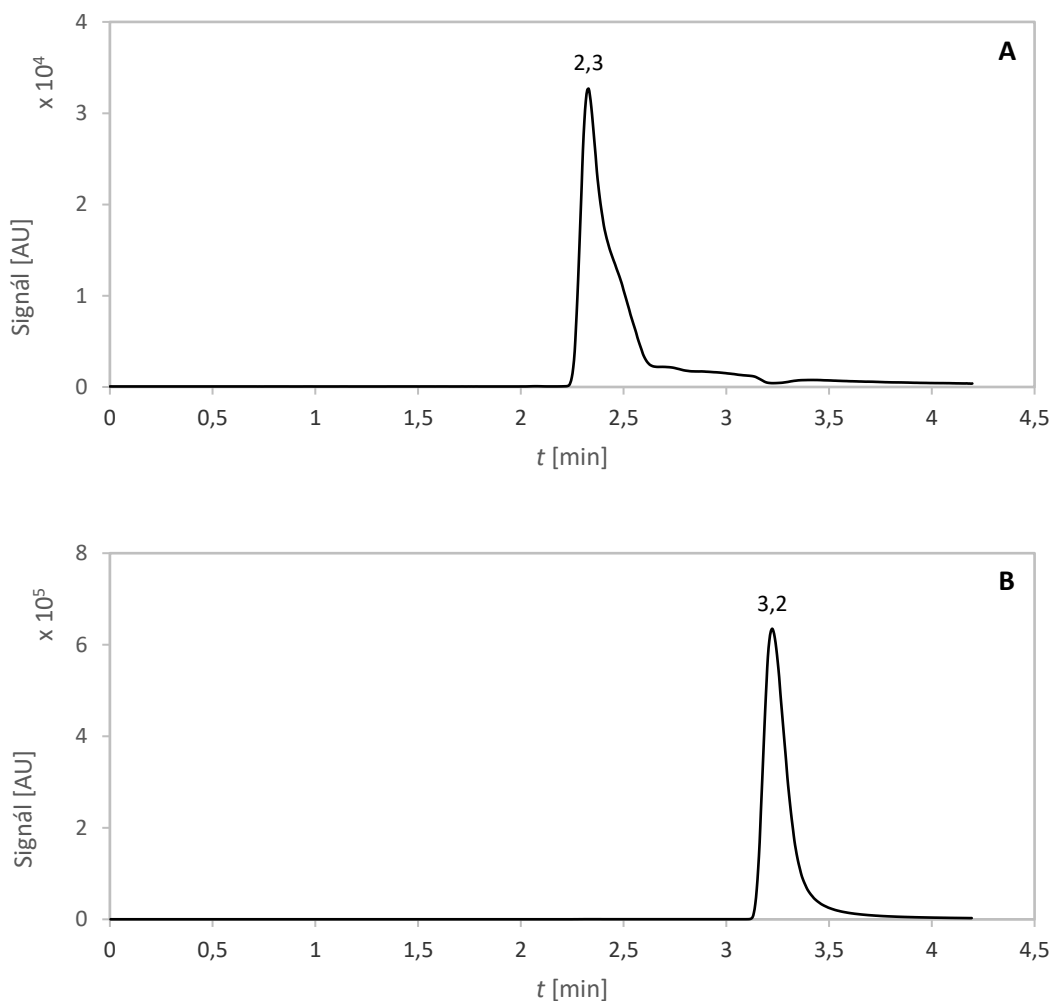
Separace byly prováděny s různými druhy mobilních fází a různými obsahy organických modifikátorů v mobilní fázi, jejich volba vycházela z literatury citované v teoretické části této bakalářské práce. Pro zvolenou optimální chromatografickou kolonu a druh mobilní fáze byla poté navržena gradientová eluce.

4.2.1 Separace v RP-HPLC módu se stacionární fází C18

MF: vodný roztok octanu amonného a acetonitril

Jako první byla pro separaci psilocinu a psilocybinu vyzkoušena kolona Supelco Discovery HS C18 (150 × 4,6 mm, 3 μm), která je díky své deklarované vysoké stabilitě (high stability, HS) a reprodukovatelnosti „run-to-run“ analýz doporučována pro spojení LC-MS. Mobilní fáze byla složena z vodného roztoku octanu amonného (5 mmol/l, pH 6,6) a acetonitrilu v poměrech 25:75, 35:65, 45:55, 55:45, 65:35 a 75:25 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min. Retenční čas psilocinu se během všech měření pohyboval v rozmezí 3,2–3,8 min. s výjimkou 25 obj. % acetonitrilu v mobilní fázi, kdy dosáhl hodnoty 4,8 min. Retenční čas psilocybinu se pohyboval v rozmezí 2,3–2,6 min. Při nízkém obsahu vodné fáze byl získán symetrický pík psilocinu, ale deformovaný pík psilocybinu, naopak při vysokém obsahu vodné fáze byl pík psilocybinu více symetrický, ale došlo k rozšíření píku psilocinu. Chromatogramy získané pro separaci na stacionární fází C18 s mobilní fází tvořenou octanovým pufrům a acetonitrem v poměru 35:65 (v/v) jsou znázorněny na obrázku 8.

Následně byla pro separaci na stejné chromatografické koloně využita jako mobilní fáze směs vodného roztoku octanu amonného (10 mmol/l, pH 6,6) a acetonitrilu v poměrech 25:75, 35:65, 45:55 (v/v). Zvýšená koncentrace pufru neovlivnila významným způsobem separaci, nedošlo k posunutí retenčních časů analytů.



Obrázek 8: Eluční křivka psilocybinu (A) a psilocinu (B) o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ na stacionární fázi C18, mobilní fáze byla tvořena vodným roztokem octanu amonného (5 mmol/l, pH 6,6) a acetonitrilem v poměru 35:65 (v/v)

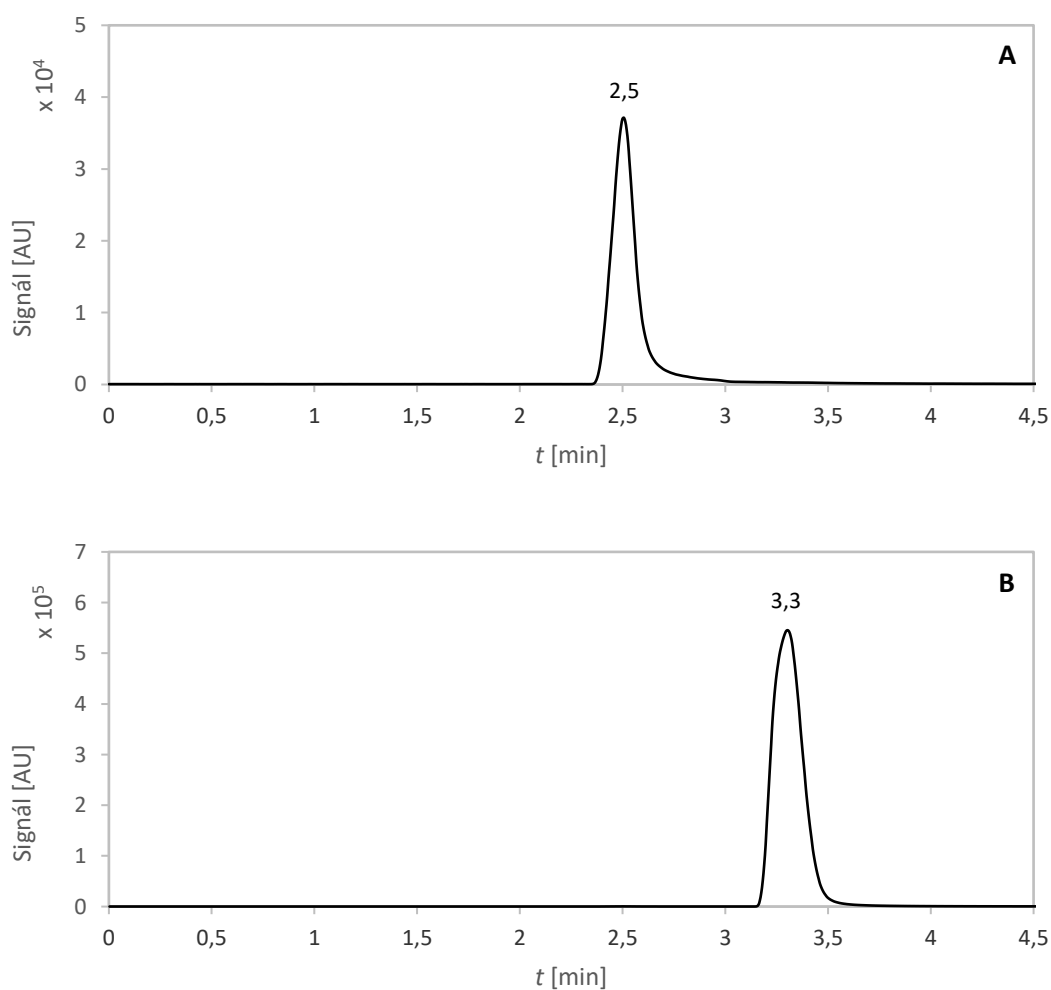
Separace na těchto dvou popsanych chromatografických systémech není vyhovující pro psilocybin, který se díky svému polárnímu charakteru na C18 nepolární stacionární fázi zadržuje jen velmi málo. Polaritu psilocybinu lze ovlivnit změnou pH mobilní fáze, proto byl následně studován i vliv pH vodné složky pufru mobilní fáze na separaci.

Nicméně použití mobilní fáze složené z vodného roztoku octanu amonného o nižším pH (5 mmol/l, pH 4,8) a acetonitrilu v poměrech 25:75, 35:65, 45:55 (v/v) na stejné chromatografické koloně vedlo pouze k nepatrnému prodloužení retenčního času psilocybinu a zkrácení retenčního času psilocinu o 0,1–0,2 min. oproti stejné mobilní fázi, kde octanový pufr měl hodnotu pH 6,6.

MF: vodný roztok mravenčí kyseliny a acetonitril s přidavkem mravenčí kyseliny

Další testovaná mobilní fáze byla tvořena 0,1% vodným roztokem mravenčí kyseliny (pH 2,6) a acetonitrilem s 0,1% obsahem mravenčí kyseliny v poměrech 25:75, 35:65, 45:55, 55:45, 65:35 a 75:25 (v/v). Průtok mobilní fáze byl opět 0,5 ml/min.

Benefitem této mobilní fáze byly více symetrické píky psilocybinu, nicméně stále nebylo dosaženo dostatečného zvýšení retence psilocybinu (retenční čas psilocybinu se prodloužil průměrně o 0,2 min. oproti mobilní fázi s octanovým pufrům o pH 6,6 a acetonitrilem). Chromatogramy získané v mobilní fázi tvořené 0,1% vodným roztokem mravenčí kyseliny a acetonitrilem s 0,1% obsahem mravenčí kyseliny v poměru 35:65 (v/v) jsou znázorněny na obrázku 9.



Obrázek 9: Eluční křivka psilocybinu (A) a psilocinu (B) o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ na stacionární fázi C18, mobilní fáze byla tvořena 0,1% vodným roztokem mravenčí kyseliny (pH 2,6) a acetonitrilem s 0,1% obsahem mravenčí kyseliny v poměru 35:65 (v/v)

MF: vodný roztok octanu amonného a methanol

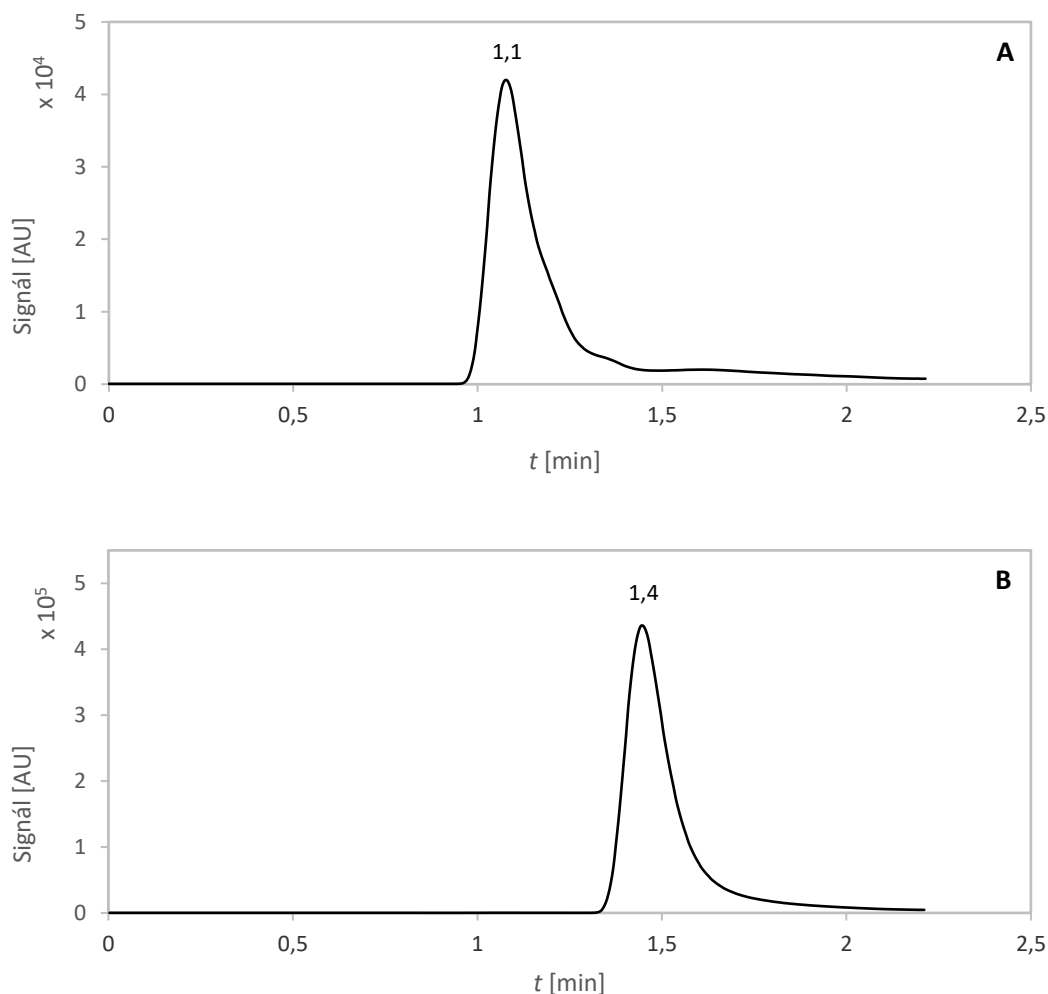
Mobilní fáze složená z vodného roztoku octanu amonného (5 mmol/l, pH 6,6) a methanolu v poměrech 25:75, 35:65, 45:55 (v/v) se ukázala pro separaci psilocinu a psilocybinu na stacionární fázi C18 jako nevhodná. Při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. se retenční čas psilocinu během všech měření držel na hodnotě 2,9 min., retenční čas psilocybinu se pohyboval v rozmezí 3,5–3,7 min. Eluční křivky analytů byly deformované a nebylo dosaženo jejich dostatečného rozlišení.

4.2.2 Separace v RP-HPLC módu se stacionární fází C8

MF: vodný roztok octanu amonného a acetonitril

Vzhledem k tomu, že na stacionární fázi C18 vykazovaly oba analyty krátkou a se změnou složení mobilní fáze prakticky neměnnou retenci, byla vybrána stacionární fáze s kratším uhlíkatým ligandem. Separace psilocinu a psilocybinu byla vyzkoušena na koloně Kinetex C8 (100 × 2,1 mm, 1,7 μm) s mobilní fází složenou z vodného roztoku octanu amonného (5 mmol/l, pH 6,6) a acetonitrilu v poměrech 25:75, 35:65, 45:55, 55:45, 65:35 a 75:25 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min. Retenční čas psilocinu se během všech měření pohyboval v rozmezí 1,4–1,5 min. s výjimkou 25 obj. % acetonitrilu v mobilní fázi, kdy došlo k výraznému rozšíření píku psilocinu a retenční čas z toho důvodu dosáhl hodnoty 1,7 min., retenční čas psilocybinu se držel na hodnotě 1,1 min. Chromatogramy získané pro separaci na stacionární fázi C8 s mobilní fází tvořenou octanovým pufrem a acetonitrem v poměru 35:65 (v/v) jsou znázorněny na obrázku 10.

Separace na tomto chromatografickém systému byla nevyhovující, jelikož oba analyty vykazovaly velmi nízkou retenci a byly eluovány krátce po mrtvém času kolony.



Obrázek 10: Eluční křivka psilocybinu (A) a psilocinu (B) o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ na stacionární fázi C8, mobilní fáze byla tvořena vodným roztokem octanu amonného (5 mmol/l, pH 6,6) a acetonitrilem v poměru 35:65 (v/v)

4.2.3 Separace v RP-HPLC módu se stacionární fází fenyl-hexyl

MF: vodný roztok octanu amonného a acetonitril

Jelikož struktura obou sledovaných analytů obsahuje aromatickou část, byla pro separaci psilocinu a psilocybinu vyzkoušena i kolona Kinetex Phenyl-Hexyl (100 \times 2,1 mm, 1,7 μm), která díky fenylové části může poskytovat i π - π interakce. Nejprve byla tato kolona vyzkoušena s mobilní fází složenou z vodného roztoku octanu amonného (5 mmol/l, pH 6,6) a acetonitrilu v poměrech 35:65, 45:55 a 65:35 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min. Retenční čas psilocinu se během všech měření pohyboval v rozmezí 1,7–1,8 min. a retenční

čas psilocybinu se držel na hodnotě 1,1 min. Podobně jako v předchozím případě, kdy stacionární fázi tvořila chemicky vázaná skupina C8, i zde oba analyty vykazovaly velmi nízkou retenci a byly eluovány krátce po mrtvém času kolony, což se dalo očekávat vzhledem k násobné vazbě v molekule acetonitrilu. Navíc byly eluční křivky psilocybinu deformované, a proto byla separace na tomto chromatografickém systému nevyhovující.

MF: vodný roztok octanu amonného a methanol

Při výměně organického modifikátoru acetonitrilu za methanol na tomtéž chromatografickém systému, ale se sníženým průtokem mobilní fáze 0,1 ml/min., došlo k posunutí retenčního času psilocinu na hodnotu 3,2 a psilocybinu na 2,5 min. při poměru octanový pufr:methanol 35:65 (v/v), ale eluční křivky analytů byly deformované a nedosahovaly dostatečného rozlišení, podobně jako tomu bylo při testování této mobilní fáze na stacionární fázi C18.

4.2.4 Separace metodou ZIC-cHILIC

MF: vodný roztok octanu amonného a acetonitril

Separace studovaných toxinů byla dále sledována na zwitterionické koloně SeQuant ZIC-cHILIC (100 × 2,1 mm, 3 μm), obsahující záporně nabitou fosfátovou skupinu a koncovou, do prostoru orientovanou, permanentně kladně nabitou amonnou skupinu, která může poskytovat iontově-výměnné nebo elektrostatické interakce. Byla vyzkoušena mobilní fáze složená z vodného roztoku octanu amonného (5 mmol/l, pH 6,6) a acetonitrilu v poměrech 15:85, 25:75 a 35:65 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min. Retenční čas psilocinu se během všech měření pohyboval v rozmezí 2,4–3,0 min., retenční čas psilocybinu nebylo možné spolehlivě určit, jelikož došlo k velmi výrazné deformaci (rozdvojení) eluční křivky psilocybinu, z toho důvodu také tento chromatografický systém nebyl vhodný k analýze psilocybinu.

4.2.5 Separace metodou BEH-HILIC

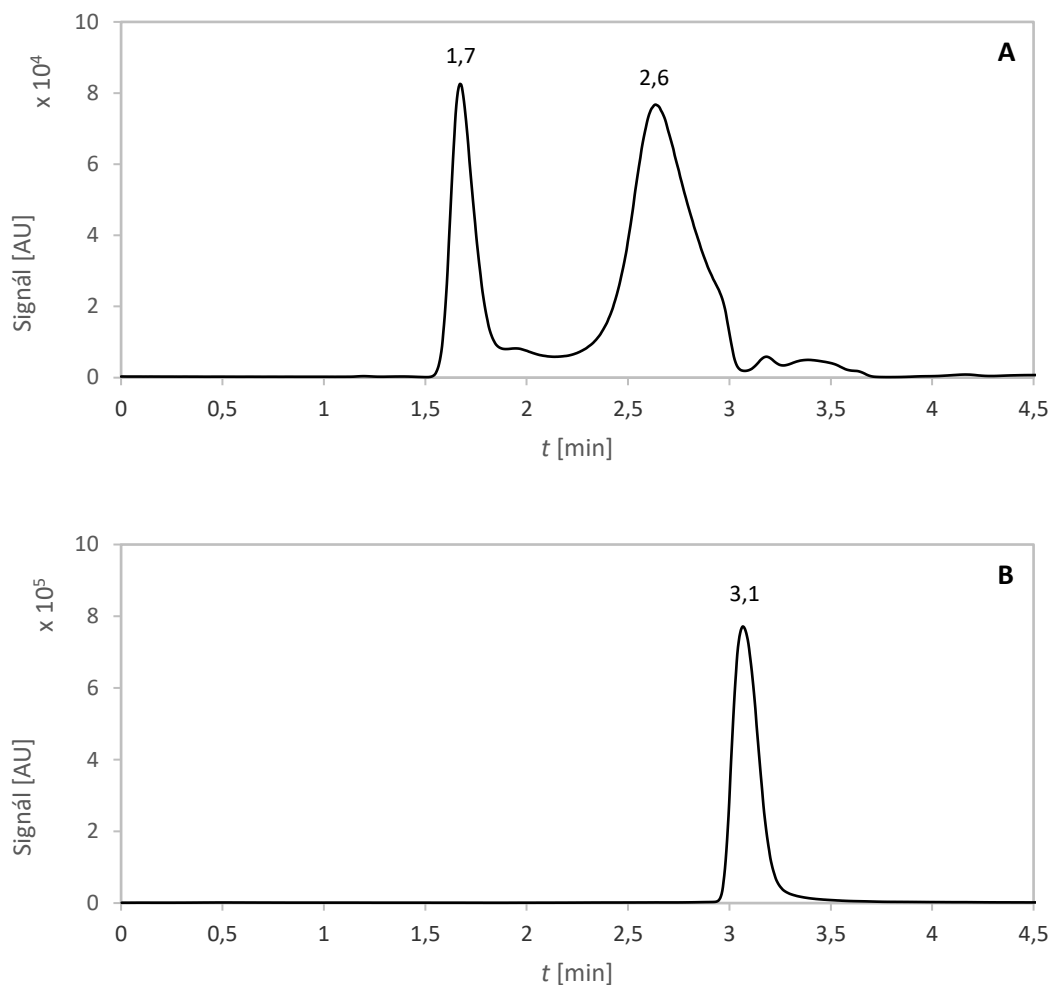
MF: vodný roztok octanu amonného a acetonitril

Jako poslední byla pro separaci psilocinu a psilocybinu vyzkoušena kolona Acquity UPLC BEH HILIC (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm) se silikagelovou stacionární fází obsahující ethylenové můstky, které jí propůjčují vysokou chemickou stabilitu. Kolona byla vyzkoušena

v kombinaci s mobilní fází složenou z vodného roztoku octanu amonného (5 mmol/l, pH 6,6) a acetonitrilu v poměrech 15:85, 20:80, 25:75, 35:65 a 45:55 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min. Retenční čas psilocinu se prodlužoval se zvyšujícím se obsahem acetonitrilu v mobilní fázi v souladu s HILIC separačním módem, počínaje od 3,0 min. při 55 obj. % acetonitrilu až k 6,0 min. při 85 obj. % acetonitrilu. Psilocybin poskytoval podobně jako na koloně ZIC-cHILIC rozdvojenou eluční křivku, maximum druhého pozdějšího píku psilocybinu se při zvyšujícím se obsahu acetonitrilu v mobilní fázi prodlužovalo.

Jelikož byla u těchto separací v nastavení hmotnostního spektrometru aktivována technologie Agilent Jet Stream, došlo ke zvýšení intenzity poskytovaného signálu oproti předchozím analýzám, a proto bylo možné snížit dávkovaný objem analyzovaného roztoku. Bylo porovnáno dávkování 1, 5 a 10 μ l standardního roztoku při poměru octanový pufr:acetonitril 35:65 (v/v), naměřené plochy píku psilocinu dosahovaly hodnot $2,9 \cdot 10^4$ AU min při nadávkování 1 μ l, $6,7 \cdot 10^6$ AU min při nadávkování 5 μ l a $1,3 \cdot 10^7$ AU min při nadávkování 10 μ l. Jako ideální intenzita signálu byla zvolena intenzita při dávkování 5 μ l, proto ve všech následujících analýzách byl dávkován objem 5 μ l. Chromatogramy pro BEH-HILIC separaci s mobilní fází tvořenou octanovým pufrem a acetonitrem v poměru 35:65 (v/v) jsou znázorněny na obrázku 11.

Při 85 obj. % acetonitrilu v mobilní fázi byl psilocybin zachycen na stacionární fázi tak, že ani po 20 minutách nedošlo k jeho eluci, ovšem následnou úpravou poměru mobilní fáze na 60 obj. % vodné složky došlo k vymytí veškerého psilocybinu z kolony v jedné zóně. Tímto se podařilo účinně zachytit psilocybin na stacionární fázi a zároveň řídit časový interval mezi elucí psilocinu a psilocybinu. Tento poznatek byl později využit k návrhu průběhu gradientové eluce.



Obrázek 11: Eluční křivka psilocybinu (A) a psilocinu (B) o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ na stacionární fázi BEH-HILIC, mobilní fáze byla tvořena vodným roztokem octanu amonného (5 mmol/l, pH 6,6) a acetonitrilem v poměru 35:65 (v/v)

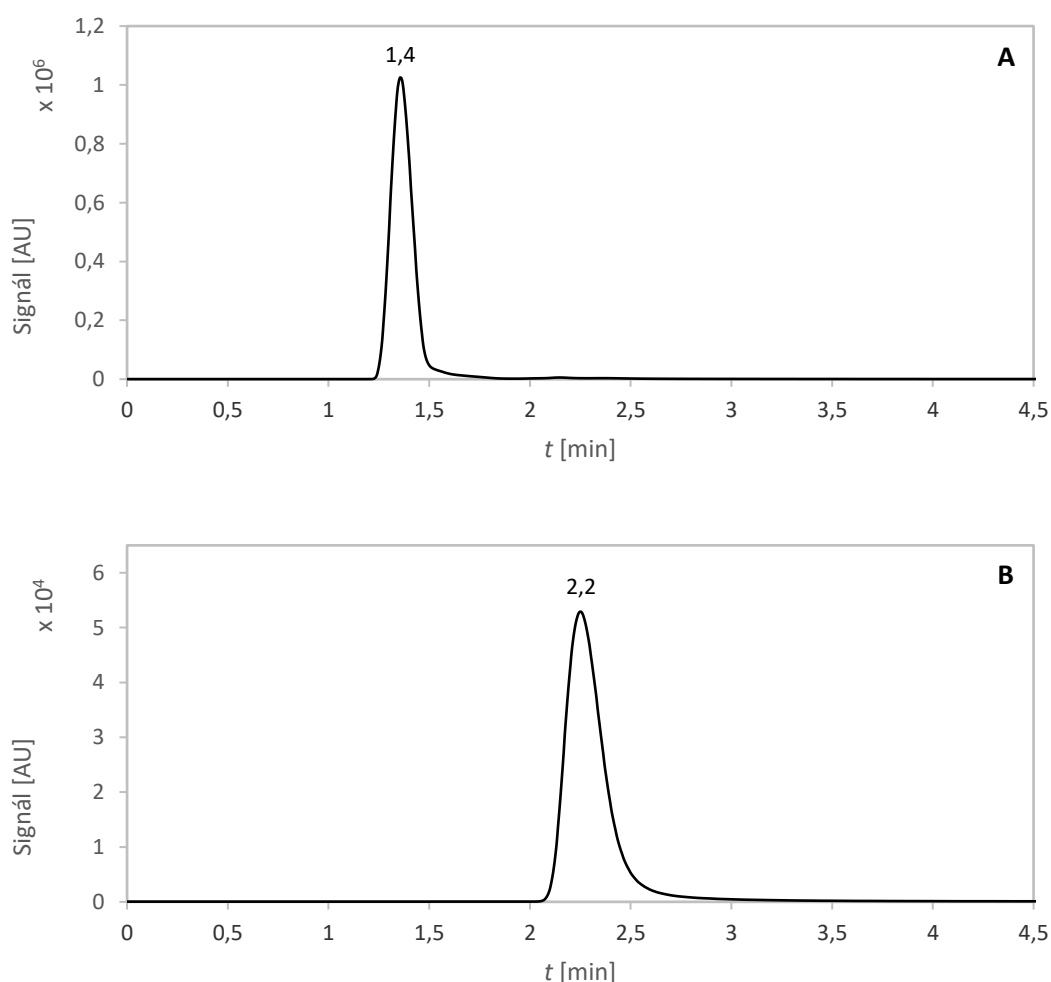
Následně byla za stejných podmínek provedena separace, kde octanový pufr v mobilní fázi měl pH 4,6, tím došlo ke zlepšení tvaru elučních křivek psilocybinu a ke zkrácení retenčních časů psilocinu. Retenční čas psilocinu vzrůstal od 1,8 min. při 65 obj. % acetonitrilu v mobilní fázi k 4,3 min. při 85 obj. % acetonitrilu.

MF: vodný roztok mravenčí kyseliny a acetonitril s přidávkem mravenčí kyseliny

Další separace byla provedena na stejné koloně s použitím mobilní fáze tvořené 0,1% vodným roztokem mravenčí kyseliny (pH 2,6) a acetonitrilem s 0,1% obsahem mravenčí kyseliny v poměrech 10:90, 15:85, 20:80, 25:75 a 35:65 (v/v). Průtok mobilní fáze byl opět 0,2 ml/min. Retenční čas psilocinu i psilocybinu vzrůstal se zvyšujícím se obsahem

acetonitrilu v mobilní fázi, u psilocinu počínaje od 1,4 min. při 65 obj. % acetonitrilu k 1,6 min. při 90 obj. % acetonitrilu, u psilocybinu od 2,2 min. při 65 obj. % acetonitrilu k 18,1 min. při 90 obj. % acetonitrilu. Eluční křivky psilocybinu byly symetričtější a nedošlo k jejich rozdělení tak jako v případě mobilní fáze s vodným roztokem octanu amonného.

Benefitem této mobilní fáze byly více symetrické píky psilocybinu a jeho eluce v jediné zóně, ale psilocin zde měl příliš nízkou retenci a byl eluován v podstatě s mrtvým časem kolony. Chromatogramy pro BEH-HILIC separaci s mobilní fází tvořenou 0,1% vodným roztokem mravenčí kyseliny a acetonitrilem s 0,1% obsahem mravenčí kyseliny v poměru 35:65 (v/v) jsou znázorněny na obrázku 12.



Obrázek 12: Eluční křivka psilocinu (A) a psilocybinu (B) o koncentraci 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ na stacionární fázi BEH-HILIC, mobilní fáze byla tvořena 0,1% vodným roztokem mravenčí kyseliny (pH 2,6) a acetonitrilem s 0,1% obsahem mravenčí kyseliny v poměru 35:65 (v/v)

Obdobných výsledků bylo dosaženo i při separaci s použitím mobilní fáze tvořené 0,05% vodným roztokem mravenčí kyseliny (pH 2,7) a acetonitrilem s 0,05% obsahem mravenčí kyseliny. Snížení obsahu mravenčí kyseliny v mobilní fázi nepomohlo zvýšit retenci psilocinu.

4.3 Optimalizace HPLC-MS/MS analýzy s gradientem mobilní fáze

Na základě provedených experimentů byl zvolen k dalším analýzám chromatografický systém tvořený kolonou Acquity UPLC BEH HILIC (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm) a mobilní fází složenou z vodného roztoku octanu amonného o koncentraci 5 mmol/l a pH 4,6 (složka A) a acetonitrilu (složka B). Zvolený průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min. a dávkovaný objem 5 μl. Analýza byla dále optimalizována použitím gradientové eluce, při níž se využilo skutečnosti, že při obsahu acetonitrilu alespoň 85 obj. % ve zvolené mobilní fázi nedochází k eluci psilocybinu, ale je eluován psilocin. Pro studium gradientové eluce byl opět využit směsný roztok standardů psilocinu a psilocybinu, kde oba analyty měly koncentraci 5 μg/ml.

Počáteční složení mobilní fáze pro gradientový program bylo A:B 15:85 (v/v), při tomto složení mobilní fáze byl eluován pouze psilocin. Dále bylo nutné navýšit obsah vodné složky mobilní fáze a snížit obsah acetonitrilu na poměr A:B 60:40 (v/v), čímž se zvýšila eluční síla a došlo k eluci psilocybinu. Následovala ekvilibrace na počáteční podmínky. Původně navržený program gradientové eluce je vyznačen v tabulce 2.

Tabulka 2: První návrh gradientové eluce na stacionární fázi BEH-HILIC, mobilní fáze tvořena složkou A = vodný roztok octanu amonného (5 mmol/l, pH 4,6) a složkou B = acetonitril

Čas [min]	A [%]	B [%]
0	15	85
4	15	85
7	60	40
11	60	40
15	15	85

Aby bylo dosaženo co nejlepší separace, bylo nutné zvolit ještě strmější gradient a zvýšit eluční sílu mobilní fáze na poměr A:B 65:35 (v/v), protože při pomalejším gradientu docházelo k nežádoucímu rozmývání píku psilocybinu v jeho sestupné části. S cílem dosáhnout co nejlepší symetrie a nejnižší šířky píku psilocybinu byly navrženy ještě čtyři další gradientové programy, z nichž ten finální je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3: Optimalizovaný program gradientové eluce na stacionární fázi BEH-HILIC, mobilní fáze tvořena složkou A = vodný roztok octanu amonného (5 mmol/l, pH 4,6) a složkou B = acetonitril

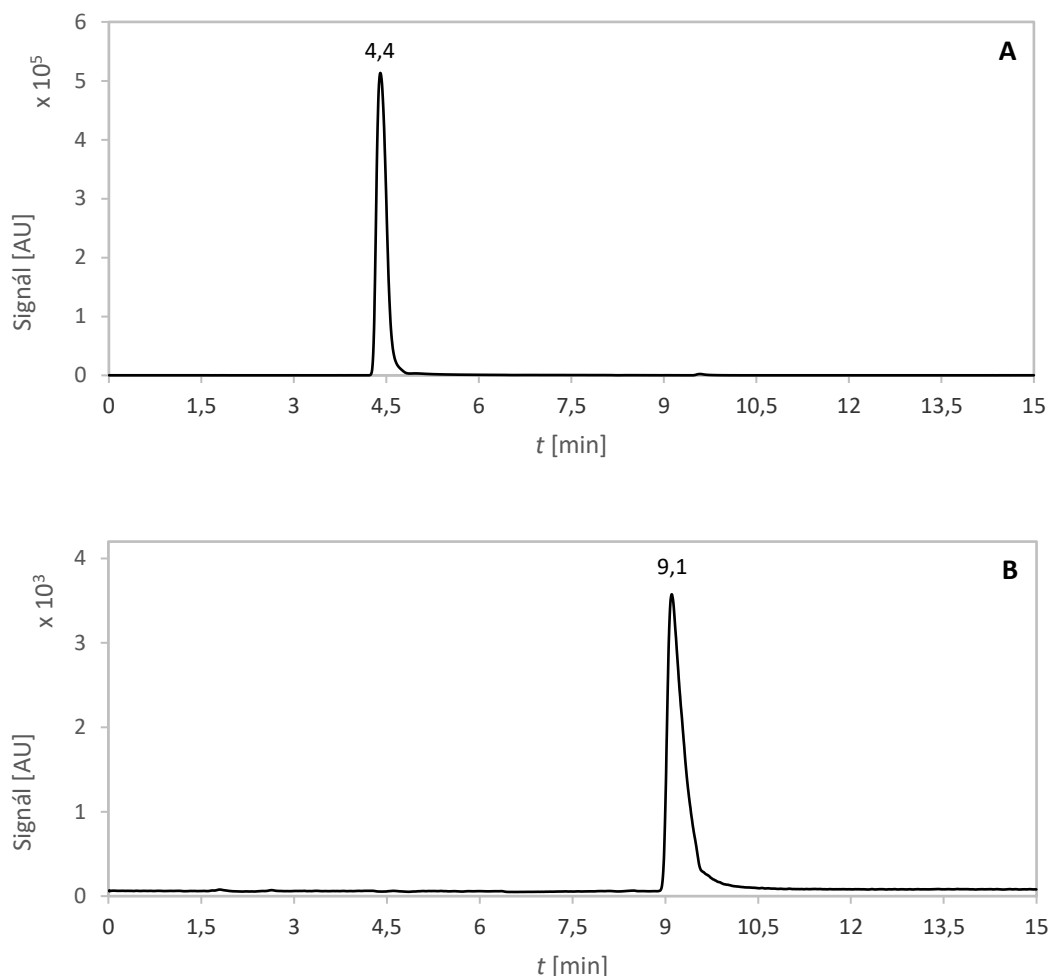
Čas [min]	A [%]	B [%]
0	15	85
4	15	85
6	65	35
10	65	35
15	15	85
20	15	85

Analýza směšného roztoku standardů v optimalizovaném gradientovém programu byla provedena celkem osmkrát a získané výsledky byly statisticky zpracovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Retenční čas psilocinu činil $4,49 \pm 0,10$ min. a psilocybinu $9,11 \pm 0,04$ min. Chromatogramy obou analytů získané za optimalizovaných podmínek gradientové eluce jsou znázorněny na obrázku 13.

S použitím mrtvého času kolony ($t_M = 1,47$ min.) byly vypočteny základní charakteristiky separace, které jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Hodnoty retenčních časů, retenčních faktorů, selektivity a rozlišení píků toxinů stanovených optimalizovanou metodou HPLC-MS/MS

Analyt	t_R [min]	k	α	$R_{1,2}$
psilocin	4,40	2,0	–	–
psilocybin	9,11	5,2	2,6	2,0



Obrázek 13: Eluční křivka psilocinu (A) a psilocybinu (B) o koncentraci 5 µg/ml na stacionární fázi BEH-HILIC při optimalizovaném programu gradientové eluce

4.4 Kvantitativní hodnocení HPLC-MS/MS analýz

Aby bylo možné kvantifikovat psilocin a psilocybin v extraktech lysohlávky kopinaté, byla nejprve pro oba analyty sestavena rovnice kalibrační přímky závislosti poměru plochy píku analytu a interního standardu psilocinu-D₁₀ na hmotnostní koncentraci analytu. To bylo provedeno pomocí optimalizované HPLC-MS/MS analýzy série směsných standardních kalibračních roztoků, jejichž příprava je popsána v kapitole 3.5.1.

Každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát, a tedy byly získány tři hodnoty poměru A/A_{IS} , ty byly statisticky zpracovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a byl z nich vypočten aritmetický průměr, výsledná hodnota byla vynesena do kalibračního grafu.

Analyzovány byly dvě odlišné kalibrační řady, první byla tvořena vodnými roztoky toxinů

a druhá roztoky toxinů ve směsi acetonitril:voda v poměru 1:1 (v/v), a to za účelem porovnání vlivu rozpouštědla na kvantifikaci psilocinu a psilocybinu ve vzorku. Vhodnější kalibrační řada byla poté využita ke kvantitativní analýze reálných vzorků.

4.4.1 Kalibrační řada vodných roztoků toxinů

Vodné kalibrační roztoky byly připraveny v rozmezí koncentrací 0,1–75 µg/ml, pro psilocybin se ovšem koncentrace 1 µg/ml nacházela pod mezí detekce a 5 µg/ml pod mezí kvantifikace, proto musela být kalibrační závislost psilocybinu sestrojena jen pro koncentrace 10–75 µg/ml. U psilocinu byla koncentrace 0,1 µg/ml pod limitem kvantifikace, proto byla kalibrační závislost psilocinu sestrojena pouze pro koncentrace 0,5–75 µg/ml. Rovnice kalibračních přímek pro oba studované analyty i jejich koeficienty determinace jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Rovnice kalibračních přímek závislosti poměru plochy píku analytu a interního standardu na hmotnostní koncentraci analytu ve vodném roztoku a jejich koeficienty determinace

Analyt	Rovnice kalibrační přímky	Koeficient determinace R^2
psilocin	$y = 0,6841 x - 0,1512$	0,9826
psilocybin	$y = 0,0412 x - 0,3809$	0,9756

4.4.2 Kalibrační řada roztoků toxinů ve směsi acetonitril:voda (1:1)

Kalibrační roztoky ve směsi acetonitrilu a vody v poměru 1:1 (v/v) byly připraveny v rozmezí koncentrací 0,05–90 µg/ml. U psilocinu však byla koncentrace 0,05 µg/ml pod mezí detekce a 0,1 µg/ml pod mezí kvantifikace. U psilocybinu byla podobně jako v případě vodných kalibračních roztoků koncentrace 1 µg/ml pod mezí detekce a 5 µg/ml pod mezí kvantifikace. Koncentrace interního standardu ve vzorcích byla optimalizována na hodnotu 2,5 µg/ml, která poskytovala vyšší intenzitu signálu než koncentrace 1 µg/ml použitá ve vodné kalibrační řadě. Kalibrační přímka psilocinu byla sestrojena pro koncentrace 0,5–90 µg/ml a psilocybinu pro koncentrace 10–90 µg/ml, rovnice těchto přímek i jejich koeficienty determinace jsou uvedeny v tabulce 6. Ke kvantifikaci analytů v reálných vzorcích byla použita pouze kalibrace ve směsi acetonitrilu a vody, jelikož poskytovala kalibrační přímky s vyšším koeficientem determinace než kalibrace s použitím vodných

roztoků a více odpovídala složení standardních roztoků.

Tabulka 6: Rovnice kalibračních přímek závislosti poměru plochy píku analytu a interního standardu na hmotnostní koncentraci analytu ve směsi acetonitril:voda (1:1) a jejich koeficienty determinace

Analyt	Rovnice kalibrační přímky	Koeficient determinace R^2
psilocin	$y = 0,3368 x + 0,0728$	0,9998
psilocybin	$y = 0,0195 x - 0,1071$	0,9993

Průměrné hodnoty poměru A/A_{IS} z tří měření každého kalibračního roztoku ve směsi acetonitrilu a vody v poměru 1:1 (v/v) včetně relativní směrodatné odchylky měření (relative standard deviation, RSD) jsou uvedeny v tabulce 7. Je patrné, že relativní směrodatné odchylky u psilocybinu jsou výrazně vyšší než u psilocinu. To je způsobeno tím, že psilocybin poskytuje v hmotnostní spektrometrii signály o nižší intenzitě než psilocin a zároveň interní standard psilocin- D_{10} není optimálním interním standardem pro psilocybin, jelikož se neeluje v jeho blízkosti a nemá dostatečně podobné fyzikálně-chemické vlastnosti.

Tabulka 7: Průměrné hodnoty poměrů plochy píku analytu a interního standardu kalibračních bodů ve směsi acetonitril:voda 1:1 (v/v) a relativní směrodatná odchylka měření ($n = 3$)

c_m [$\mu\text{g/ml}$]	Průměr A/A_{IS}		RSD [%]	
	psilocin	psilocybin	psilocin	psilocybin
0,5	0,179	–	1,49	–
1	0,376	–	0,47	–
5	1,923	–	0,82	–
10	3,292	0,083	0,41	3,40
15	5,117	0,178	1,91	7,27
25	8,750	0,409	0,12	1,87
50	16,671	0,851	0,22	0,48
90	30,456	1,656	3,15	5,07

– pod mezí kvantifikace

Určení meze detekce a meze stanovitelnosti

Experimentálně zjištěnou mezí detekce pro roztoky toxinů ve směsi acetonitrilu a vody v poměru 1:1 (v/v) byla nejnižší koncentrace analytu v kalibrační řadě roztoků, která poskytla analytický signál jasně odlišitelný od šumu. U psilocybinu takto určená mez detekce činila 5,00 µg/ml, u psilocinu pak 0,10 µg/ml. Ze zjištěných mezí detekce byly vypočítány meze stanovitelnosti, které jsou uvedeny v tabulce 8. Jelikož rozdíly koncentrací mezi jednotlivými body kalibrační řady byly poměrně vysoké, mohou být experimentálně určené hodnoty LOD a LOQ o něco vyšší než skutečné hodnoty LOD a LOQ.

Proto byla mez detekce a mez stanovitelnosti určena také výpočtem z hodnoty šumu základní linie chromatogramu podle rovnic č. 4 a 5. Výsledné hodnoty mezí detekce a stanovitelnosti jsou uvedeny také v tabulce 8. Mez detekce určená výpočtem za využití šumu základní linie chromatogramu je přesnější než experimentální mez detekce, proto jako mez detekce a mez stanovitelnosti byly brány hodnoty určené výpočtem pomocí šumu.

Tabulka 8: Mez detekce a mez stanovitelnosti psilocinu a psilocybinu určená experimentálně a pomocí výpočtu za využití šumu základní linie chromatogramu

Způsob určení	LOD [µg/ml]		LOQ [µg/ml]	
	psilocin	psilocybin	psilocin	psilocybin
experimentální	0,10	5,00	0,33	16,67
vypočet pomocí šumu	0,06	2,86	0,19	9,53

4.5 Optimalizace extrakce

Reálné vzorky, získané extrakcí *Psilocybe semilanceata* methanolem nebo extrakcí hluboce eutektickými rozpouštědly, byly vhodně upraveny (způsob úpravy je uveden v kapitole 3.5.2) a byly analyzovány optimalizovanou HPLC-MS/MS metodou. Všechny extrakty byly bezbarvé. Vzorky zředěných methanolických extraktů byly proměřeny vždy třikrát, a tedy byly získány tři hodnoty poměru A/A_{IS} , ze kterých byla určena hmotnostní koncentrace zředěného roztoku pomocí rovnice kalibrační přímky uvedené v tabulce 6. Následně bylo započítáno ředění a byl stanoven hmotnostní obsah analytu v původním extraktu, vztažený na hmotnost houbového materiálu použitého k extrakci. Výsledky jsou uváděny jako aritmetický průměr z těchto tří měření. Vzorky zředěných extraktů s hluboce

eutektickými rozpouštědly byly měřeny pouze jedenkrát, a tedy byla získána pouze jediná hodnota poměru A/A_{IS} , která sloužila k dalším výpočtům.

Byl sledován vliv úpravy extraktu na výsledek analýzy a rozdíl mezi extrakcí pomocí methanolu a pomocí dvou hluboce eutektických rozpouštědel, který je detailněji diskutován v kapitole 4.6.1.

4.5.1 Extrakce methanolem

Extrakce psilocinu a psilocybinu methanolem byla studována kineticky, postup je uveden v kapitole 3.3. Klobouk první použité plodnice lysohlávky kopinaté byl rozdělen na část o hmotnosti 17,8 mg (dále označována jako klobouk 1) a část o hmotnosti 15,7 mg (dále označována jako klobouk 2).

V prvním měření byly odebrány vzorky po 1, 20 a 91 hodinách extrakce a byly ředěny dvěma způsoby – směsí acetonitril:voda v poměru 1:1 (v/v), anebo vodou. Tímto způsobem byl opět zkoumán vliv rozpouštědla na kvantifikaci psilocinu a psilocybinu ve vzorku. Stanovené hmotnostní obsahy analytů v methanolicích extraktech, vztažené na gram navážky houbového materiálu, jsou uvedeny v tabulce 9 při ředění směsí acetonitril:voda a v tabulce 10 při ředění vodou.

Tabulka 9: Stanovené hmotnostní obsahy analytů v methanolicích extraktech po 1, 20 a 91 hodinách extrakce získané analýzou extraktů ředěných směsí acetonitril:voda 1:1 (v/v)

Délka extrakce [hod]	Hmotnostní obsah [mg/g]					
	Klobouk 1		Klobouk 2		Třeň	
	psilocin	psilocybin	psilocin	psilocybin	psilocin	psilocybin
1	0,05	5,52	0,06	6,70	–	2,07
20	0,12	6,24	0,12	6,73	0,03	2,13
91	0,13	11,10	0,12	10,33	0,05	2,95

– pod mezí kvantifikace

Tabulka 10: Stanovené hmotnostní obsahy analytů v methanolických extraktech po 1, 20 a 91 hodinách extrakce získané analýzou extraktů ředěných vodou

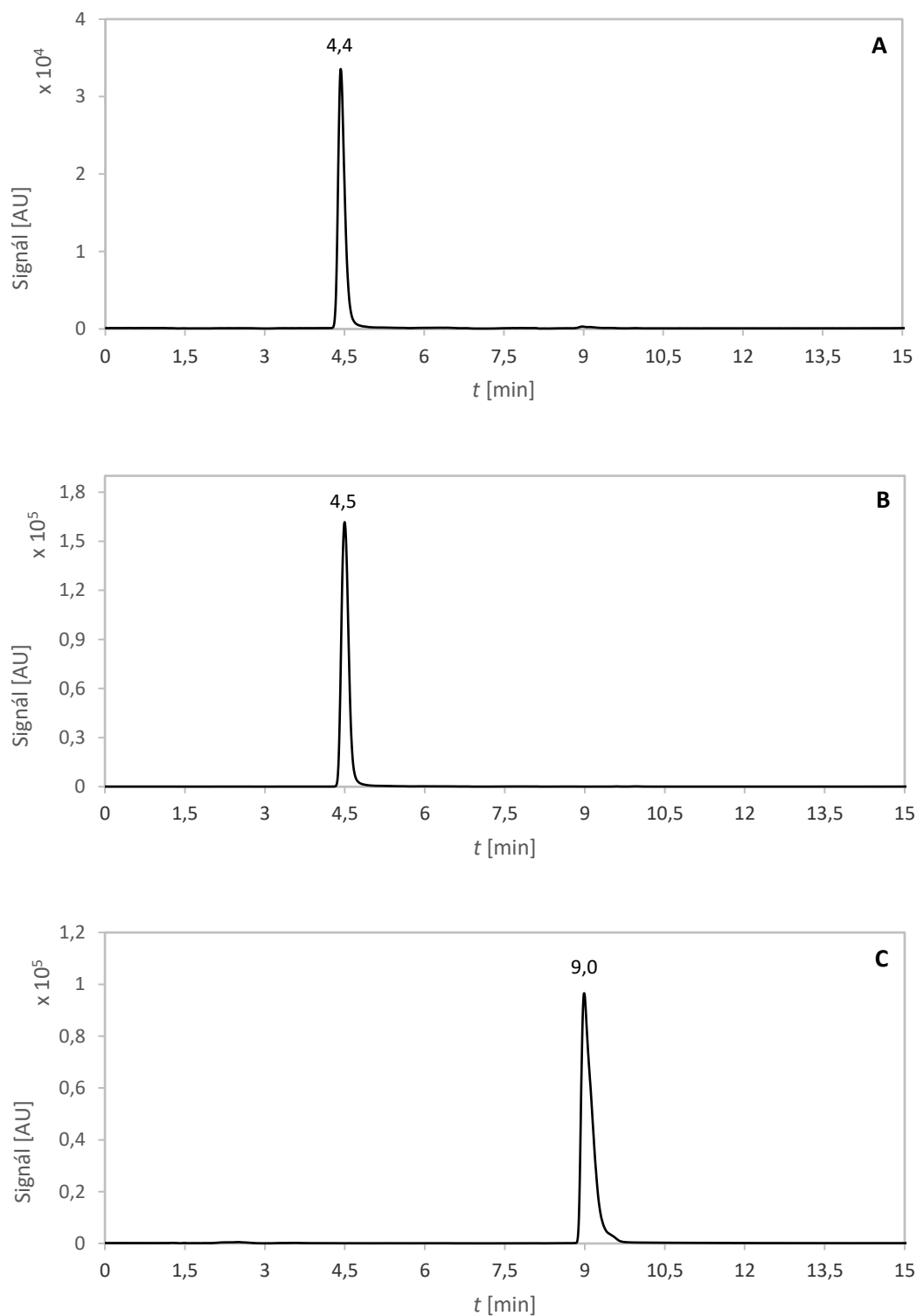
Délka extrakce [hod]	Hmotnostní obsah [mg/g]					
	Klobouk 1		Klobouk 2		Třeň	
	psilocin	psilocybin	psilocin	psilocybin	psilocin	psilocybin
1	0,04	5,71	0,06	8,76	–	3,00
20	0,15	8,82	0,15	10,26	0,03	3,10
91	0,15	13,55	0,15	14,18	0,05	4,39

– pod mezí kvantifikace

Z porovnání stanovených hmotnostních obsahů při obou způsobech ředění extraktu vyplývá, že je vhodnější ředit methanolický extrakt pouze vodou, jelikož získáme vyšší naměřené obsahy obou analytů. Zároveň při tomto způsobu ředění je v roztoku vzorku poměr voda:organická fáze přibližně 1:1 (v/v), což odpovídá poměru voda:acetonitril v použité kalibrační řadě roztoků toxinů.

Bude-li se uvažovat, že po 91 hodinách bylo extrahováno veškeré množství sledovaných toxinů, pak po 1 hodině došlo k extrakci přibližně 33 hm. % psilocinu a 52 hm. % psilocybinu z klobouku (určeno zprůměrováním hodnot pro klobouk 1 a klobouk 2).

Chromatogramy při extrakci *Psilocybe semilanceata* methanolem 1 hodinu, kdy byl extrakt ředěný vodou, jsou uvedeny na obrázku 14. Retenční časy analytů odpovídají retenčním časům při analýze směšného roztoku standardů optimalizovanou HPLC-MS/MS metodou.



Obrázek 14: Eluční křivka psilocinu (A), psilocinu- D_{10} (B) a psilocybinu (C) při extrakci klobouku 1 *Psilocybe semilanceata* methanolem 1 hodinu, extrakt byl ředěný vodou

Jelikož už po první hodině extrakce bylo extrahováno významné množství toxinů, byla v následujícím experimentu sledována detailněji extrakce klobouku lysohlávky kopinaté v časovém úseku od 20 do 90 minut. Bylo zvoleno ředění extraktů pouze vodou. Zde byl klobouk o hmotnosti 22,5 mg extrahován v celku. Stanovené hmotnostní obsahy analytů v methanolických extraktech, vztažené na gram navážky houbového materiálu, jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11: Stanovené hmotnostní obsahy analytů v methanolických extraktech po 20, 40, 60 a 90 minutách extrakce získané analýzou extraktů klobouku ředěných vodou

Délka extrakce [min]	Hmotnostní obsah [mg/g]	
	Klobouk	
	psilocin	psilocybin
20	–	1,52
40	0,02	2,02
60	0,03	3,24
90	0,04	3,24

– pod mezí kvantifikace

Při druhé provedené extrakci lysohlávky kopinaté methanolem bylo zjištěno, že obsah psilocybinu v extraktu lze stanovit už po 20 minutách extrakce a obsah psilocinu po 40 minutách extrakce. Rychlost extrakce se postupně snižuje, polárnější psilocybin se extrahuje rychleji a ve větším množství.

4.5.2 Extrakce hluboce eutektickými rozpouštědly

Dalšími studovanými extrakčními činidly byla hluboce eutektická rozpouštědla, která jsou více šetrná k životnímu prostředí než methanol. Provedení extrakce je popsáno v kapitole 3.3. Jednalo se pouze o pilotní experimenty, jejich účelem bylo především zjistit, jestli je extrakce pomocí DES vůbec možná a jestli ji lze kombinovat s HPLC-MS/MS metodou analýzy.

Prvním použitým DES byla směs cholinchloridu a ethylenglykolu, 1 hodinu byl extrahován klobouk lysohlávky kopinaté o hmotnosti 8,5 mg, vzniklý extrakt byl ve dvou variantách zředěn buď 50×, anebo 25× methanolem. Methanolem ředěné extrakty byly před měřením ještě dvakrát zředěny vodou, aby byl podobně jako v předchozích extrakcích zajištěn poměr

voda:organická fáze přibližně 1:1 (v/v), a byl k nim přidán interní standard. Druhým použitým DES byla směs cholinchloridu a mléčné kyseliny, jejíž extrakty byly zpracovány obdobným způsobem, extrahován byl klobouk lysohlávky kopinaté o hmotnosti 12,6 mg. Stanovené hmotnostní obsahy analytů v extraktech DES, vztažené na gram navážky houbového materiálu, jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12: Stanovené hmotnostní obsahy analytů v extraktech DES s ethylenglykolem a mléčnou kyselinou, získané analýzou extraktů ředěných methanolem a vodou

Ředění methanolem	Hmotnostní obsah [mg/g]			
	DES s ethylenglykolem		DES s mléčnou kyselinou	
	psilocin	psilocybin	psilocin	psilocybin
25×	0,08	33,69	0,14	27,16
50×	0,11	20,57	0,14	24,35

Extrakce byla úspěšná, nicméně stanovené hmotnostní obsahy analytů v extraktech DES jsou zatíženy velkou chybou, a to z několika důvodů, které jsou diskutovány níže.

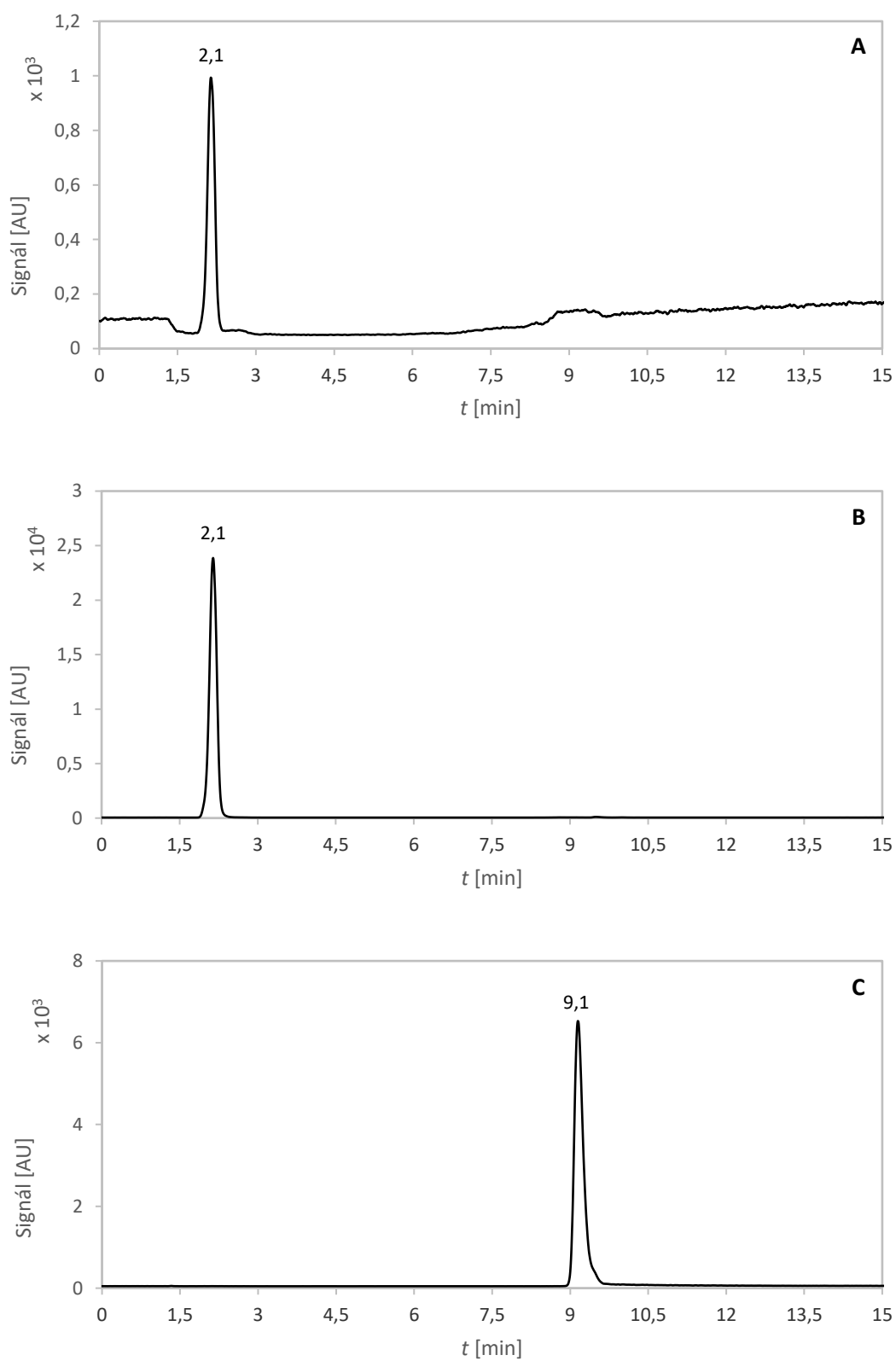
Naměřený poměr plochy psilocinu a interního standardu se nacházel u všech měření extraktů DES pod mezí stanovitelnosti, tím pádem bylo možné provést výpočet hmotnostní koncentrace extraktu pouze po výrazné aproximaci kalibrační rovnice, kdy byl zanedbán úsek na ose y.

Zatímco retenční čas psilocybinu u všech roztoků extraktů DES odpovídal retenčnímu času při analýze roztoku standardů optimalizovanou HPLC-MS/MS metodou, retenční čas psilocinu a interního standardu byl výrazně zkrácen. Při použití směsi cholinchloridu a ethylenglykolu měl retenční čas psilocinu hodnotu 2,2 min. při zředění 25× methanolem a 3,6 min. při zředění 50× methanolem. Z tohoto rozdílu je patrné, že ředění extraktu neovlivnilo jen intenzitu měřeného signálu, ale i samotnou separaci. Při použití směsi cholinchloridu a mléčné kyseliny měl retenční čas psilocinu hodnotu 2,1 min. při zředění 25× methanolem a 2,4 min. při zředění 50× methanolem.

K ovlivnění retence psilocinu v přítomnosti hluboce eutektických rozpouštědel mohlo dojít vlivem interakce DES s tímto analytem nebo reverzibilní modifikací stacionární fáze DES. Čím vyšší byla koncentrace DES ve vzorku, tím více byla retence psilocinu ovlivněna. Kvůli tomuto jevu by bylo vhodné připravit novou kalibrační řadu, která by svým složením

odpovídala složení vzorků a byla by stejnou měrou ovlivněna přítomností DES, tím už se nicméně tato bakalářská práce nezabývala, extrakce DES zde byly provedeny pouze jako pilotní experimenty.

Chromatogramy extraktů obsahujících ethylenglykol byly zatíženy vysokým šumem pozadí, proto se na základě provedených experimentů jako vhodnější k extrakci sledovaných toxinů jeví DES s mléčnou kyselinou, a to extrakt ředěný 25× methanolem, který poskytl symetričtější eluční křivky a vyšší intenzitu signálu než extrakt ředěný 50× methanolem. Pro určení optimálního hluboce eutektického rozpouštědla k extrakci psilocinu a psilocybinu z lysohlávky kopinaté a optimálního způsobu úpravy extraktu by však bylo nutné provést ještě další analýzy. Chromatogramy při extrakci *Psilocybe semilanceata* směsí cholinchloridu a mléčné kyseliny 1 hodinu, kdy extrakt byl ředěný 25× methanolem, jsou uvedeny na obrázku 15.



Obrázek 15: Eluční křivka psilocinu (A), psilocinu-D₁₀ (B) a psilocybinu (C) při extrakci klobouku *Psilocybe semilanceata* směsí cholinchloridu a mléčné kyseliny 1 hodinu, extrakt byl ředěný 25× methanolem

4.6 Stanovení obsahu toxinů v lysohlávce kopinaté

4.6.1 Porovnání obsahů zjištěných při různých způsobech extrakce

Obsah psilocinu a psilocybinu po jedné hodině extrakce byl stanoven celkem ve čtyřech kloboucích lysohlávky kopinaté. Dvakrát se jednalo o extrakci methanolem, jednou o extrakci směsí cholinchloridu a ethylenglykolu a jednou o extrakci směsí cholinchloridu a mléčné kyseliny. Všechny tyto extrakty po úpravě obsahovaly methanol a vodu přibližně v poměru 1:1 (v/v). Pro první extrakci methanolem byly zprůměrovány hodnoty zjištěné pro obě poloviny klobouku (klobouk 1 a klobouk 2). Pro extrakty DES byly vybrány hodnoty při ředění 25× methanolem. Stanovené hmotnostní obsahy toxinů, vztažené na gram navážky houbového materiálu, byly statisticky zpracovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. V tabulce 13 jsou uvedeny stanovené obsahy toxinů po jedné hodině extrakce při použití různých extrakčních činidel (pro extrakce methanolem včetně intervalu spolehlivosti a relativní směrodatné odchylky měření).

Tabulka 13: Hmotnostní obsahy toxinů v kloboucích lysohlávky kopinaté po 1 hodině extrakce, určené při čtyřech různých extrakcích s různými plodnicemi lysohlávky kopinaté ($n = 3$)

Způsob extrakce	Hmotnostní obsah [mg/g]		RSD [%]	
	psilocin	psilocybin	psilocin	psilocybin
1. extrakce methanolem	0,05 ± 0,00	7,24 ± 0,15	0,64	0,96
2. extrakce methanolem	0,03 ± 0,00	3,24 ± 0,26	1,03	3,67
DES s ethylenglykolem	0,08	33,69	–	–
DES s mléčnou kys.	0,14	27,16	–	–

– nelze určit, jelikož měření bylo provedeno jen jedenkrát

Rozdíl v hmotnostním obsahu toxinů mezi první a druhou extrakcí methanolem může být způsoben tím, že se množství toxinů v různých plodnicích lysohlávky kopinaté může lišit. Zároveň se u druhé extrakce objevila vyšší relativní směrodatná odchylka měření, to může být způsobeno tím, že hmotnostní obsah toxinů je zde určen jako součet stanovené hmotnosti toxinů v extraktu po 60 minutách a vypočítaných hmotností toxinů, které byly z extraktu odebrány po 20 a 40 minutách extrakce, tím pádem vzniká větší prostor pro chybu.

Hmotnostní obsahy určené při extrakci hluboce eutektickými rozpouštědly jsou pravděpodobně falešně vyšší, takto vysoký obsah analytů pouze po jedné hodině extrakce je velmi nepravděpodobný. Chyba při stanovení analytů v extraktech DES může být způsobena tím, že ke kvantifikaci byly použity kalibrační roztoky, které neodpovídaly složení vzorku a analyty zde měly rozdílné retenční časy. Zároveň naměřený poměr plochy píku psilocinu a interního standardu se nacházel pod mezí stanovitelnosti. Dále plocha píku psilocybinu byla vztažena na interní standard psilocin-D₁₀, který nespĺňuje požadavky pro optimální interní standard daného analytu. Nakonec měření s roztoky extraktů DES bylo provedeno pouze jedenkrát, takže není eliminována možnost získání odlehlého výsledku.

Z naměřených chromatogramů na obrázku 15 je zřejmé, že analyty lze extrahovat pomocí DES, nicméně jejich kvantifikaci je třeba provést za jiných podmínek než v této bakalářské práci.

4.6.2 Celkový obsah toxinů stanovený při extrakci methanolem

První extrakce methanolem probíhala celkem 91 hodin, uvažuje se, že po této době došlo k extrakci veškerého množství sledovaných toxinů. V tabulce 14 je uveden zjištěný celkový hmotnostní obsah psilocinu a psilocybinu v hmotnosti sušiny klobouku (určený jako aritmetický průměr hmotnostního obsahu zjištěného pro obě části klobouku) a třeně lysohlávky kopinaté, včetně intervalu spolehlivosti a relativní směrodatné odchylky měření.

Tabulka 14: Stanovený hmotnostní obsah toxinů v klobouku a tření *Psilocybe semilanceata* po 91 hodinách extrakce methanolem a relativní směrodatná odchylka měření ($n = 3$)

Extrahovaná část	Hmotnostní obsah		RSD	
	[mg/g]		[%]	
	psilocin	psilocybin	psilocin	psilocybin
klobouk	0,14 ± 0,00	13,87 ± 0,54	0,09	1,75
třeň	0,05 ± 0,01	4,39 ± 0,42	4,97	4,34

Celkový stanovený hmotnostní obsah psilocinu v *Psilocybe semilanceata* (určený jako součet obsahu v klobouku a v třeni) byl $0,19 \pm 0,01$ mg/g, což odpovídá $0,02 \pm 0,00$ % psilocinu v hmotnosti sušiny, a hmotnostní obsah psilocybinu byl $18,25 \pm 0,78$ mg/g, což odpovídá $1,83 \pm 0,08$ % psilocybinu v hmotnosti sušiny. Tento výsledek je v souladu s hodnotami uváděnými v literatuře. Průměrný obsah toxinů v *Psilocybe semilanceata* je 0,02 % psilocinu a 0,98 % psilocybinu v hmotnosti sušiny, obsah psilocybinu však může kolísat mezi hodnotami 0,2–2,37 % (cit. ⁹).

5 Závěr

Intoxikace houbami rodu *Psilocybe*, ať už úmyslně pro jejich halucinogenní účinky, nebo po neúmyslném požití nezkušenými houbaři, může vést k pozměněnému vnímání okolí a být příčinou nehod a zdravotních komplikací. Objektivní diagnostika při intoxikacích lysohlávkami je důležitá nejen v klinické praxi, ale i v soudním lékařství.

V této bakalářské práci byla úspěšně vyvinuta a optimalizována metoda HPLC-MS/MS s gradientovou elucí pro analýzu dvou nejvýznamnějších toxinů obsažených v houbách rodu *Psilocybe*, psilocinu a psilocybinu. Chromatografický systém byl tvořený kolonou Acquity UPLC BEH HILIC (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm) a mobilní fází složenou z vodného roztoku octanu amonného o koncentraci 5 mmol/l a pH 4,6 (složka A) a z acetonitrilu (složka B).

Extrakt klobouku a třeně lysohlávky kopinaté pomocí methanolu byl analyzován optimalizovanou HPLC-MS/MS metodou. Extrakce byla sledována kineticky, obsah psilocybinu v extraktu bylo možné stanovit už po 20 minutách extrakce, obsah psilocinu po 40 minutách extrakce. Rychlost extrakce se s časem postupně snižovala. Celkový stanovený obsah analytů činil $0,02 \pm 0,00$ % psilocinu a $1,83 \pm 0,08$ % psilocybinu v hmotnosti sušiny analyzované lysohlávky kopinaté. Z toho přibližně tři čtvrtiny toxinů byly obsažené v klobouku a jedna čtvrtina v třeni. Stanovené hmotnostní obsahy analytů jsou v souladu s údaji uváděnými v odborné literatuře.

Dále byla provedena analýza extraktu klobouku lysohlávky kopinaté pomocí hluboce eutektických rozpouštědel, která v současnosti nabývají na popularitě díky jejich šetrnosti k životnímu prostředí. Použitými hluboce eutektickými rozpouštědly byla směs cholinchloridu a ethylenglykolu a směs cholinchloridu a mléčné kyseliny. Extrakt směsí cholinchloridu a mléčné kyseliny, 25× zředěný methanolem, poskytl chromatogram se symetrickými, dobře oddělenými píky psilocinu a psilocybinu. Tento způsob extrakce má potenciální využitelnost, nicméně je potřeba provést další experimenty a optimalizovat proces kvantifikace toxinů, aby bylo možné porovnat extrakci směsí cholinchloridu a mléčné kyseliny s extrakcí methanolem a diskutovat její výhody a nevýhody.

Poznatky zjištěné v této bakalářské práci mohou sloužit k dalšímu studiu extrakce psilocinu a psilocybinu hluboce eutektickými rozpouštědly a jako základ pro vývoj metody stanovení těchto toxinů v tělních tekutinách běžně využívaných v klinické praxi, jako je krev, moč nebo žaludeční výplach.

Použitá literatura

1. Hagara, L., Antonín, V., Baier, J. *Velký atlas hub*. (Ottovo nakladatelství, 2005).
2. Kothe, H. W. *Houby: Určování a sběr*. (Ikar, 2007).
3. Pelclová, D. (vedoucí TIS). *Zpráva o činnosti Toxikologického informačního střediska (TIS) v roce 2020*. (2021).
4. Komínková, L. Otravy makromycetami v období 2001-2016. *Diplomová práce*. (Univerzita Karlova, 2018).
5. Zadák, Z., Havel, E. a kolektiv. *Intenzivní medicína na principech vnitřního lékařství*. (Grada Publishing, 2007).
6. Ševela, K., Ševčík, P. a kolektiv. *Akutní intoxikace a léková poškození v intenzivní medicíně*. (2. vydání, Grada Publishing, 2011).
7. Merová, B., Staňková, M., Stříbrný, J., Ondra, P. LC-MS: Objektivní metoda diagnostiky intoxikací muchomůrkami. *Chem. Listy* **106**, 831–835 (2012).
8. Hirt, M., Vorel, F. a kolektiv. *Soudní lékařství II. díl*. (Grada Publishing, 2016).
9. Stamets, P. *Halucinogenní houby světa*. (Volvox Globator, 2000).
10. Antonín, V. a kolektiv. *Houby: česká encyklopedie: neobvyklá kniha o světě hub u nás i v cizině, praktická příručka houbaře pro určování, sběr, ochranu, pěstování a zpracování hub*. (Reader's Digest Výběr, 2003).
11. Hagara, L. *Ottova encyklopedie hub*. (Ottovo nakladatelství, 2014).
12. Bartůšek, M., Tejkal, K. Myko atlas. Citováno 29.5.2021, dostupné z <https://www.myko.cz/myko/public/taxon/Psilocybe-semilanceata>.
13. Zhuk, O., Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A. *et al.* Research on acute toxicity and the behavioral effects of methanolic extract from psilocybin mushrooms and psilocin in mice. *Toxins (Basel)* **7**, 1018–1029 (2015).
14. Gotvaldová, K., Hájková, K., Borovička, J. *et al.* Stability of psilocybin and its four analogs in the biomass of the psychotropic mushroom *Psilocybe cubensis*. *Drug Test. Anal.* **13**, 439–446 (2021).
15. Borowiak, K. S., Ciechanowski, K., Waloszczyk, P. Psilocybin mushroom (*Psilocybe semilanceata*) intoxication with myocardial infarction. *J. Toxicol. - Clin. Toxicol.* **36**, 47–49 (1998).

16. Passie, T., Seifert, J., Schneider, U., Emrich, H. M. The pharmacology of psilocybin. *Addict. Biol.* **7**, 357–364 (2002).
17. Česká mykologická společnost. Jedovaté houby a podobné jedlé druhy. Citováno 31.3.2021, dostupné z <https://www.myko.cz/houby/jedovate-houby/>.
18. Mosher, C. J., Akins, S. M. *Drugs and drug policy: The control of consciousness alteration*. (3rd edition, SAGE Publications, 2021).
19. Dinis-Oliveira, R. J. Metabolism of psilocybin and psilocin: clinical and forensic toxicological relevance. *Drug Metab. Rev.* **49**, 84–91 (2017).
20. Martin, R., Schürenkamp, J., Gasse, A., Pfeiffer, H., Köhler, H. Determination of psilocin, bufotenine, LSD and its metabolites in serum, plasma and urine by SPE-LC-MS/MS. *Int. J. Legal Med.* **127**, 593–601 (2013).
21. Gupta, R. C. *Veterinary toxicology: Basic and clinical principles*. (Elsevier, 2007).
22. Halberstadt, A. L., Vollenweider, F. X., Nichols, D. E. *Behavioral neurobiology of psychedelic drugs*. (Springer, 2018).
23. Anastos, N., Barnett, N. W., Pfeffer, F. M., Lewis, S. W. Investigation into the temporal stability of aqueous standard solutions of psilocin and psilocybin using high performance liquid chromatography. *Sci. Justice - J. Forensic Sci. Soc.* **46**, 91–96 (2006).
24. Orden, R. C. Van. Determination of psilocybin and psilocin in hallucinogenic mushrooms by HPLC with diode array and MS detection. *Master's thesis*. (State University of New York, 2008).
25. Martin, R., Schürenkamp, J., Pfeiffer, H., Köhler, H. A validated method for quantitation of psilocin in plasma by LC-MS/MS and study of stability. *Int. J. Legal Med.* **126**, 845–849 (2012).
26. Fricke, J., Blei, F., Hoffmeister, D. Enzymatic synthesis of psilocybin. *Angew. Chemie Int. Ed.* **56**, 12352–12355 (2017).
27. Sherwood, A. M., Halberstadt, A. L., Klein, A. K. *et al.* Synthesis and biological evaluation of tryptamines found in hallucinogenic mushrooms: Norbaeocystin, baecocystin, norpsilocin, and aeruginascin. *J. Nat. Prod.* **83**, 461–467 (2020).
28. Gonmori, K., Fujita, H., Yokoyama, K., Watanabe, K., Suzuki, O. Mushroom toxins: A forensic toxicological review. *Forensic Toxicol.* **29**, 85–94 (2011).

29. Nováková, L., Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.* (Europrint, 2013).
30. Ibanez, E., Cifuentes, A. *Green extraction techniques: Principles, advances and applications.* (Elsevier, 2017).
31. Havlikova, M., Cabala, R., Pacakova, V., Bosakova, Z. Critical evaluation of microextraction pretreatment techniques—Part 2: Membrane-supported and homogenous phase based techniques. *J. Sep. Sci.* **42**, 303–318 (2019).
32. Zainal-Abidin, M. H., Hayyan, M., Hayyan, A., Jayakumar, N. S. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Anal. Chim. Acta* **979**, 1–23 (2017).
33. Sutton, A. T., Fraige, K., Leme, G. M. *et al.* Natural deep eutectic solvents as the major mobile phase components in high-performance liquid chromatography—searching for alternatives to organic solvents. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**, 3705–3713 (2018).
34. Nováková, L., Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* (Europrint, 2013).
35. Heftmann, E. *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods.* (Elsevier, 2004).
36. Ho, W. F., Stuart, B., Prichard, E. *High performance liquid chromatography.* (Royal Society of Chemistry, 2003).
37. Lough, W. J., Wainer, I. W. *High performance liquid chromatography: Fundamental principles and practice.* (Blackie Academic & Professional, 1995).
38. Tanase, M., Bacalum, E., David, V. Variability of temperature dependences of the retention of strongly polar compounds under ZIC-HILIC liquid chromatographic mechanism. *Sep. Sci. Plus* **2**, 12–17 (2019).
39. Grumbach, E. S., Diehl, D. M., Neue, U. D. The application of novel 1.7 μm ethylene bridged hybrid particles for hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* **31**, 1511–1518 (2008).
40. Swartz, M. HPLC detectors: A brief review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **33**, 1130–1150 (2010).
41. Swadesh, J. *HPLC: Practical and industrial applications.* (CRC Press, 1997).
42. Gauglitz, G., Moore, D. S. *Handbook of spectroscopy.* (2nd edition, Wiley, 2014).
43. Gross, J. H. *Mass spectrometry: A textbook.* (2nd edition, Springer, 2011).

44. Hoffmann, E. De, Stroobant, V. *Mass spectrometry: Principles and applications*. (3rd edition, John Wiley & Sons, 2007).
45. Friedecký, D., Lemr, K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.* **20**, 152–157 (2012).
46. Niessen, W. M. A. *Liquid chromatography-mass spectrometry*. (3rd edition, CRC Press, 2006).
47. Rácz, N., Nagy, J., Jiang, W., Veress, T. Modeling retention behavior on analysis of hallucinogenic mushrooms using hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **57**, 230–237 (2019).
48. Tsujikawa, K., Kanamori, T., Iwata, Y. *et al.* Morphological and chemical analysis of magic mushrooms in Japan. *Forensic Sci. Int.* **138**, 85–90 (2003).
49. Pedersen-Bjergaard, S., Sannes, E., Rasmussen, K. E., Tønnesen, F. Determination of psilocybin in *Psilocybe semilanceata* by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **694**, 375–381 (1997).
50. Saito, K., Toyo'oka, T., Kato, M. *et al.* Determination of psilocybin in hallucinogenic mushrooms by reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta* **66**, 562–568 (2005).
51. Anastos, N., Lewis, S. W., Barnett, N. W., Sims, D. The determination of psilocin and psilocybin in hallucinogenic mushrooms by HPLC utilizing a dual reagent acidic potassium permanganate and tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection system. *J. Forensic Sci.* **51**, 45–51 (2006).
52. Gambaro, V., Roda, G., Visconti, G. L. *et al.* Taxonomic identification of hallucinogenic mushrooms seized on the illegal market using a DNA-based approach and LC/MS-MS determination of psilocybin and psilocin. *J. Anal. Bioanal. Tech.* **6**, 277 (2015).
53. Pichini, S., Marchei, E., García-Algar, O. *et al.* Ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of hallucinogenic drugs in hair of psychedelic plants and mushrooms consumers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **100**, 284–289 (2014).

-
54. Hasler, F., Bourquin, D., Brenneisen, R., Bär, T., Vollenweider, F. X. Determination of psilocin and 4-hydroxyindole-3-acetic acid in plasma by HPLC-ECD and pharmacokinetic profiles of oral and intravenous psilocybin in man. *Pharm. Acta Helv.* **72**, 175–184 (1997).
 55. Wurst, M., Kysilka, R., Koza, T. Analysis and isolation of indole alkaloids of fungi by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **593**, 201–208 (1992).
 56. Stříbrný, J., Borovička, J., Sokol, M. Obsah psilocybinu a psilocinu v některých druzích hub. *Soud. Lek.* **48**, 45–49 (2003).
 57. Yamaguchi, M., Saito, T., Horiguchi, Y. *et al.* Preparation of monoclonal antibodies reactive to a hallucinogenic drug, psilocin. *J. Heal. Sci.* **50**, 600–604 (2004).
 58. Rodriguez-Cruz, S. E. Analysis and characterization of psilocybin and psilocin using liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS) with collision-induced-dissociation (CID) and source-induced-dissociation (SID). *Microgram J.* **3**, 175–182 (2005).

Použité obrázky

1. Česká mykologická společnost. *Psilocybe semilanceata*. Citováno 29.5.2021, dostupné z <https://www.myko.cz/myko-atlas/Psilocybe/>.
2. Houbaření – Atlas hub. *Psilocybe arcana*. Citováno 29.5.2021, dostupné z https://www.houbareni.cz/houba/lysohlavka_tajemna.
3. Česká mykologická společnost. *Psilocybe bohemica*. Citováno 29.5.2021, dostupné z <https://www.myko.cz/myko-atlas/Psilocybe/>.
4. Psilosophy. *Psilocybe moravica*. Citováno 29.5.2021, dostupné z http://www.en.psilosophy.info/species/psilocybe_moravica.htm.
5. Struktura psilocybinu (A), psilocinu (B) a serotoninu (C). Vytvořeno v programu Biovia Draw 2019 (Dassault Systèmes).
6. Struktura baeocystinu (A) a norbaeocystinu (B). Vytvořeno v programu Biovia Draw 2019 (Dassault Systèmes).
7. Vysušené plodnice *Psilocybe semilanceata*. Foceno 4.2.2021.
- 8.–15. Chromatogramy vytvořené na základě experimentálních dat v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation).