UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza
Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza

Lukáš Cudlman

ANALÝZA TOXINŮ MUCHOMŮRKY ZELENÉ METODOU HPLC

Analysis of toxins in *Amanita phalloides* by HPLC

Bakalářská práce

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

Praha 2017

Prohlášení

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

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

V Praze dne 14. května 2017.

Poděkování

Rád bych poděkoval mé školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za odborné vedení, přátelské pracovní prostředí, příjemnou atmosféru a všestrannou pomoc při vypracovávání této bakalářské práce. Rád bych také poděkoval svým rodičům za veškerou podporu během mého studia.

Obsah

1 Úvod ... 8
1.1 Charakteristika houbových intoxikací ... 8
1.2 Cíle práce ... 9
2 Teoretická část ... 10
2.1 Houby rodu *Amanita* ... 10
2.1.1 Muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*) ... 10
2.1.2 Bílá forma muchomůrky zelené (*Amanita phalloides var. alba*) ... 11
2.1.3 Klinické příznaky a průběh otravy muchomůrkou zelenou ... 13
2.2 Studované toxiny muchomůrky zelené ... 13
2.2.1 Amatoxiny ... 14
2.2.2 Falotoxiny ... 15
2.3 Metoda kapalinové chromatografie ... 16
2.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ... 16
2.3.1.1 RP-HPLC ve spojení s DAD detekcí (RP-HPLC-DAD) ... 17
2.4 Přímá extrakce ... 18
2.5 Extrakce na tuhé fázi ... 19
2.6 Metody pro stanovení toxinů muchomůrky zelené ... 20
2.6.1 Způsoby detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii ... 21
2.7 Vyhodnocení chromatografických analýz ... 22
2.8 Vyhodnocení extrakčních analýz na tuhé fázi ... 22
3 Experimentální část ... 24
3.1 Chemikálie ... 24
3.2 Instrumentace ... 25
3.3 Příprava vodné složky mobilní fáze ... 26
3.4 Příprava standardních roztoků pro optimalizaci HPLC ... 26
3.5 Příprava standardních roztoků pro optimalizaci SPE ... 26
3.6 Přímá extrakce toxinů muchomůrky zelené ... 27
3.7 Příprava reálných vzorků pro analýzy ... 27
3.8 Kvalitativní hodnocení ... 28
4 Výsledky a diskuse ... 29
4.1 Optimalizace HPLC-DAD separace ... 29
4.1.1 Výběr vhodného organického modifikátoru mobilní fáze ... 29
4.1.2 Výběr pH vodné složky mobilní fáze ... 31

4.2 Optimalizace přímé extrakce 34
4.3 Optimalizace extrakce na tuhé fázi 34
4.4 Kvalitativní hodnocení 37
4.5 Výtěžnosti extrakce na tuhé fázi pro reálné vzorky 38
5 Závěr 41
6 Literatura 42

Seznam zkratek a použitých symbolů

c	molární koncentrace
C_{18}	oktadecyl
C_2	ethyl
C_8	oktyl
C_{30}	triakontyl
CZE	kapilární zónová elektroforéza (z angl. „Capillary zone electrophoresis“)
DAD	detektor diodového pole (z angl. „Diode array detector“)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. „Deoxyribonucleic acid“)
ELISA	ELISA (z angl. „Enzyme-linked immunosorbent assay“)
F_m	objemová průtoková rychlost mobilní fáze
GC	plynová chromatografie (z angl. „Gas chromatography“)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (z angl. „Hydrophilic and ionic interaction liquid chromatography“)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. „High performance liquid chromatography“)
HPLC-DAD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí diodovým polem
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (z angl. „High performance thin-layer chromatography“)
k	retenční faktor
LC	kapalinová chromatografie (z angl. „Liquid chromatography“)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LD_{50}	střední letální dávka
LLE	extrakce kapaliny kapalinou (z angl. „Liquid-liquid extraction“)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. „Messenger ribonucleic acid“)
MS	hmotnostní spektrometr (z angl. „Mass spectrometer“)
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normální fázi (z angl. „Normal-phase HPLC“)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. „Polymerase chain reaction“)

Ph	fenyl
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
R	výtěžnost (účinnost) extrakce na tuhé fázi
$R_{1,2}$	rozlišení dvou sousedních píků
RIA	radioimunoanalýza (z angl. „Radioimmunoassay“)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. „Ribonucleic acid“)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (z angl. „Reverse-phase HPLC“)
RP-HPLC-DAD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi s detekcí diodovým polem
RPM	počet otáček za minutu (z angl. „Rotation per minute“)
SPE	extrakce na tuhé fázi (z angl. „Solid-phase extraction“)
t_M	mrtvý retenční čas
t_R	retenční čas
T	teplota
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. „Ultra-high performance liquid chromatography“)
UV/VIS	ultrafialové/viditelné záření (z angl. „Ultraviolet/Visible“)
V	objem
v/v	objemové zlomky
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. „Thin-layer chromatography“)
w	šířka píku při základně
α	separační faktor (selektivita)
λ	vlnová délka

1 Úvod

1.1 Charakteristika houbových intoxikací

Po celém světě i v České republice dochází každoročně k častým houbovým intoxikacím. Nejzávažnější houbové otravy jsou způsobovány především rodem *Amanita* (muchomůrky). Mezi nejznámější zástupce tohoto rodu patří bezesporu muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*) [1, 2], která je svojí velmi vysokou toxicitou zodpovědná za více než 90 % smrtelných případů způsobených otravou houbami [3 – – 6]. Do tohoto rodu dále patří muchomůrka tygrovaná (*Amanita pantherina*) [2], muchomůrka jarní (*Amanita verna*), jedlá muchomůrka růžovka (*Amanita rubescens*) a další [7]. Plodnice muchomůrky zelené můžou být při sběru mylně zaměňovány za jiné zelené plodnice hub, např. za jedlou holubinku trávozelenou a holubinku nazelenalou, často také s některými jedlými druhy pečárek (žampionů). Existují druhy muchomůrek, jako jsou muchomůrka červená (*Amanita muscaria*) a muchomůrka tygrovaná, které jsou zneužívány pro svoje psychotropní účinky [2].

Velmi vysoká toxicita muchomůrky zelené je především způsobena třemi skupinami cyklopeptidů, a to jsou amatoxiny, falotoxiny a virotoxiny. Průběhy otrav jsou charakteristické těžkými průjmy s následnou dehydratací organismu, dále hypoglykemií, silnými bolestmi břicha, selháním jater a ledvin a často končí smrtí [1, 3, 7].

V západní Evropě dochází každoročně k 50 – 100 smrtelným otravám muchomůrkou zelenou, zatímco v USA je známo méně než sto smrtelných případů po dobu pěti let [8].

V České republice se v současné době využívá k vyšetření houbových otrav subjektivních metod, založených na mikroskopické identifikaci přítomných spor. Časté problémy mohou být způsobeny nesprávným odběrem žaludečního obsahu, kdy je k toxikologickému vyšetření dodán čirý výplach žaludku, ale již bez přítomnosti spor. Proto se v současné době vyvíjejí objektivní postupy, založené na identifikaci otrav způsobených muchomůrkou zelenou, využívající chromatografických metod. V naší republice je možné stanovit toxiny muchomůrky pomocí nedávno vyvinuté metody LC-MS (v roce 2012), avšak v řadě menších laboratoří po republice není tato metoda přístupná z finančního hlediska [2].

1.2 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je vypracování a optimalizace analytické metody s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí diodovým polem (HPLC--DAD) pro identifikaci vybraných amatoxinů (α-amanitinu a β-amanitinu) a falotoxinů (falacidinu a faloidinu) v muchomůrce zelené. Další bod této práce spočívá v otestování možnosti prekoncentrace všech studovaných toxinů pomocí extrakce na tuhé fázi (SPE) za účelem dosažení co nejvyšší extrakční výtěžnosti.

2 Teoretická část

2.1 Houby rodu *Amanita*

Houby rodu *Amanita*, muchomůrky, jsou z hlediska výživy saprofytické organismy, tzn., že získávají živiny rozkladem odumřelého organického materiálu. Z biologického hlediska jsou muchomůrky zařazovány do čeledi muchomůrkovitých (*Amanitaceae*), která spadá do třídy stopkovýtrusých hub (*Basidiomycetes*). Rod *Amanita* zahrnuje přes třicet druhů hub a od ostatních hub se odlišuje typickými znaky, kterými jsou vnější závoj, prsten, volné lupeny a bílé spóry [7].

Kromě muchomůrky zelené (*Amanita phalloides*) patří také mezi smrtelně jedovaté houby muchomůrka jízlivá (*Amanita virosa*), muchomůrka královská (*Amanita regalis*) a muchomůrka jarní [6, 7, 9, 10]. Naopak mezi jedlé druhy muchomůrek je zařazována muchomůrka růžovka (*Amanita rubescens*), zvaná „masák“, muchomůrka šedivka (*Amanita spissa*) či muchomůrka císařka (*Amanita caesaria*) [7].

2.1.1 Muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*)

Muchomůrka zelená (viz obr. 1) je jedna z nejjedovatějších hub na celém světě [1, 2]. Svou vysokou toxicitou je zodpovědná za více než 90 % smrtelných případů vzniklých její požitím [3 – 6], hlavně kvůli toxickým amatoxinům, které působí negativně na jaterní a ledvinné buňky [1, 2, 6, 7].

Plodnice houby je v mládí uzavřena do vnějšího závoje, tzv. plachetky, která se v dospělosti trhá. Stupnice barev klobouku je velmi rozmanitá a je velmi rizikovým faktorem pro nezkušené houbaře [7]. Okraj klobouku je žlutého, olivově zeleného až slabě hnědého zabarvení, do středu vybíhají radiálně žíhané odstíny světleji žluté až bílé barvy [5 – 7]. U dospělé plodnice se velikost klobouku pohybuje okolo 6 – 12,5 cm [6, 7, 9, 10]. Klobouk je zprvu zvoncovitý, později u vyspělejších plodnic sklenutý až plochý [9, 10]. Bílé až bělavé lupeny jsou husté a volné. Třeň je válcovitý, bělavý nebo žlutozelený, ukončený mohutnou a měkkou hlízou, uzavřenou v nápaditou bílou pochvu, tzv. „kalich smrti“, který je výrazným poznávacím znakem této houby. Na vrcholu třeně se nachází bílý nepravidelný prsten [5, 7, 9, 10]. Muchomůrka zelená má údajně příjemnou, až nasládlou chuť [7, 9, 10]. Zbarvení muchomůrky zelené se mění

s počasím, půdními podmínkami a s věkem, proto pro její určení není barva ani výskyt spolehlivým znakem [5, 6, 7]. Roste v symbióze s listnatými stromy (buky, duby) v období od června do října [6, 7, 9, 10]. Je rozšířená po celé Evropě [1, 5, 6], dále se vyskytuje v Jižní a Severní Americe či ve východní Asii [1, 6].

2.1.2 Bílá forma muchomůrky zelené (*Amanita phalloides var. alba*)

Tato „bílá forma kalichu smrti“ (viz obr. 2) se vyskytuje vzácněji oproti výskytu muchomůrky zelené, avšak ve stejné době a na stejných místech. Všemi znaky se téměř shoduje s muchomůrkou zelenou. Klobouk bývá méně polokulovitý až plochý a plodnice je bíle zabarvená [8, 9].

Obsahuje shodnou genetickou informaci jako muchomůrka zelená, a proto z biologického hlediska patří do stejného druhu. Kvůli celkovému nižšímu obsahu toxinů je tato forma *Amanita phalloides var. alba* o něco méně toxičtější. Množství toxinů, obsažené ve všech částech houbové tkáně této bílé formy muchomůrky zelené, je bohatě dostačující k usmrcení zdravého člověka [8].

Obr. 1. Muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*) [8, 11].

Obr. 2. Bílá forma muchomůrky zelené (*Amanita phalloides var. alba*) [11].

2.1.3 Klinické příznaky a průběh otravy muchomůrkou zelenou

Klinické příznaky po otravě muchomůrky zelené probíhají ve dvou fázích a jsou úměrné množství požitého jedu. Během první fáze, za kterou jsou zodpovědné falotoxiny, je zasažen gastrointestinální trakt s příznaky objevujícími se 6 – 24 hodin po požití. První fáze ustává po 24 – 48 hodinách s následnou dehydratací, hypoglykemií, průjmem a zvracením. Následuje klidové mezidobí, trvající 2 – 3 dny, ve kterém má člověk zdánlivý pocit uzdravení, i když tomu tak ve skutečnosti není. Druhá fáze je zahájena celkovou slabostí a postupně selhávajícími játry. Dále selhává centrální nervový systém, objevují se deprese a silné křeče a nastává jaterní selhání kvůli celkové nekróze jaterních i ledvinných buněk. Po požití většího množství houby dochází bez následné léčby k úmrtí obvykle 4. – 7. den po intoxikaci [1, 3, 7].

2.2 Studované toxiny muchomůrky zelené

Za toxicitu muchomůrky zelené jsou zodpovědné tři skupiny cyklických peptidů, a to amatoxiny, falotoxiny a virotoxiny. Z klinického hlediska jsou nejdůležitější amatoxiny a falotoxiny [1, 2, 6, 7, 12], které byly poprvé izolovány z muchomůrky zelené, zatímco virotoxiny byly poprvé izolovány z muchomůrky jízlivé [4].

Jsou to bílé, krystalické a polární látky bez chuti a zápachu [4, 6, 7, 12]. Rozpouští se snadno v methanolu a pyridinu. Méně rozpustné jsou v ethanolu a ve vodě. Málo rozpustné jsou ve vyšších alkoholech a zcela nerozpustné jsou v diethyletheru [12].

Obsah toxinů v plodnicích se může měnit rozdílnými klimatickými podmínkami. Je odlišný mezi různými druhy muchomůrek a také v rámci jednoho konkrétního druhu. Navíc rozdílné množství toxinu bylo nalezeno v různých částech houby i v různých vývojových fázích plodnice [7, 8, 13]. Uvádí se, že klobouk, prsten a lupeny mají nejvyšší koncentraci amatoxinů, zatímco pochva houby je nejbohatší na falotoxiny [6].

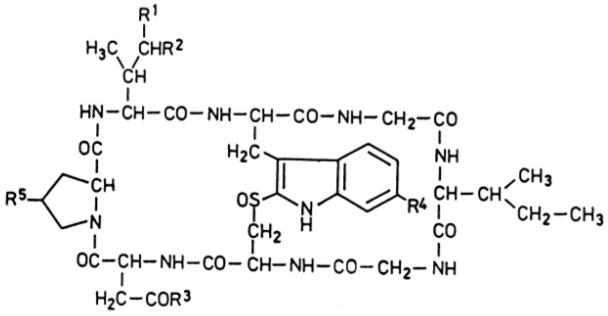
2.2.1 Amatoxiny

Amatoxiny jsou bicyklické oktapeptidy, které se vyznačují vysokou termostabilitou – nelze je zničit varem, mražením, konzervováním ani sušením [6, 14]. Jsou rezistentní vůči enzymovému působení a degradaci kyselinami [6]. Skupina amatoxinů zahrnuje α-amanitin, β-amanitin, γ-amanitin, ε-amanitin, amanin, amaninamid, amanullin, amanullinovou kyselinu a proamanullin (viz obr. 3). Amatoxiny ve své chemické struktuře obsahují neobvyklý tryptathioninový můstek mezi tryptofanovým a cysteinovým zbytkem a liší se v počtu hydroxylací na bočních řetězcích [1, 6].

Amatoxiny způsobují v jádrech buněk eukaryotních organismů inhibici RNA polymeras, hlavně inhibici jaterního enzymu RNA polymerasy II. Tato inhibice je způsobena vytvořením pevného komplexu RNA polymerasy II s amatoxinem. Tím se zastaví tvorba mRNA, následně se přeruší proteosyntéza, tedy syntéza bílkovin. Dochází hlavně k odumírání jaterních a částečně ledvinných buněk [1, 2, 6]. Amanitiny se při otravě zpětně resorbují střevem, znovu se dostávají do jater a tím se jaterní buňky opakovaně poškozují. Proto nejdůležitějším léčebným zákrokem je odstranění amatoxinu z cirkulace podáním černého uhlí nebo solnými projímadly [15].

Svým chemickým složením jsou to nejjedovatější toxiny v muchomůrce zelené a za velmi silné otravy je zodpovědný zejména α-amanitin, ale také β-amanitin [7, 15]. Amatoxiny se svými absorpčními vlastnostmi v gastrointestinálním traktu liší od falotoxinů [3, 6, 8]. Amatoxiny jsou pomalu působící jedy s desetkrát až dvacetkrát vyšší toxicitou než falotoxiny (rychle působící jedy) [6, 8, 16].

Přítomnost amatoxinů byla prokázána i u některých druhů bedel (*Lepiota*) nebo čepičatek (*Galerina*) [1, 6, 12, 17, 18].



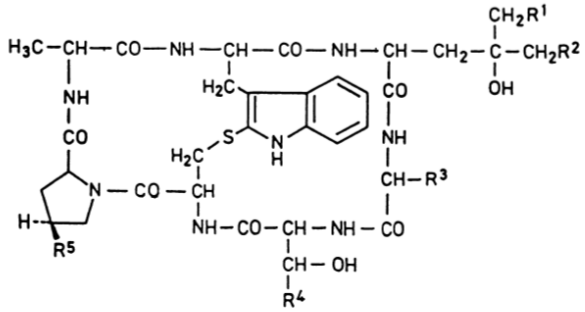
Compounds	Substituents					LD_{50} (mg/kg)
	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	
α -Amanitin	CH_2OH	OH	NH_2	OH	OH	0,3
β -Amanitin	CH_2OH	OH	OH	OH	OH	0,5
γ -Amanitin	CH_3	OH	NH_2	OH	OH	0,2
ε -Amanitin	CH_3	OH	OH	OH	OH	0,3
Amanin	CH_2OH	OH	OH	H	OH	0,5
Amanin amide	CH_2OH	OH	NH_2	H	OH	0,3
Amanullin	CH_3	H	NH_2	OH	OH	20
Amanullinic acid	CH_3	H	OH	OH	OH	20
Proamanullin	CH_3	H	NH_2	OH	H	20

Obr. 3. Chemická struktura a hodnoty LD_{50} různých amatoxinů [1].

2.2.2 Falotoxiny

Falotoxiny jsou svým chemickým složením bicyklické heptapeptidy [4, 6, 7, 8]. Ve srovnání s amatoxiny jsou falotoxiny o trochu mírnější jedy, protože nejsou tak termorezistentní a degradují se vyšší teplotou či trávicími enzymy [8]. Mezi falotoxiny patří faloidin, faloin, profalin, falisin, falacin, falacidin, falisacin (viz obr. 4). Různorodost mezi falotoxiny je podobná jako u amatoxinů, způsobena rozdíly v hydroxylaci bočních řetězců [1, 6, 17]. Za silné otravy jsou hlavně zodpovědné faloidin a falacidin. Jsou rychle působícími jedy, které se nevstřebávají gastrointestinálním traktem, proto toxicita falotoxinů nemá význam při peronálním podání. Při intravenózním podání mají falotoxiny podobné účinky na funkčnost buněk jako amatoxiny, což bylo prokázáno na potkanech [2, 12].

Falotoxiny se silně vážou na F-aktinové filamenty buněčných membrán a inhibují konverzi F-aktinu na G-aktin, a tím narušují dynamickou rovnováhu těchto obou forem, které jsou nezbytné pro správnou funkčnost buňky [1, 2, 6, 8].



Compounds	Substituents					LD_{50} (mg/kg)
	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	
Phalloidin	OH	H	CH_3	CH_3	OH	2,0
Phalloin	H	H	CH_3	CH_3	OH	1,5
Prophallin	H	H	CH_3	CH_3	H	100
Phallisin	OH	OH	CH_3	CH_3	OH	2,5
Phallacin	H	H	$CH(CH_3)_2$	COOH	OH	1,5
Phallacidin	OH	H	$CH(CH_3)_2$	COOH	OH	1,5
Phallisacin	OH	OH	$CH(CH_3)_2$	COOH	OH	4,5

Obr. 4. Chemická struktura a hodnoty LD_{50} různých falotoxinů [1].

2.3 Metoda kapalinové chromatografie

Chromatografie je separační proces, založený na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze, a to mobilní (pohyblivou) fází – eluentem a stacionární (nepohyblivou) fází – sorbentem. V kapalinové chromatografii (LC, z angl. „Liquid chromatography“) je mobilní fází kapalina. Rozdílné analyty (dělené látky) mají rozdílnou afinitu ke stacionární fázi, a tím podléhají různé distribuci (rozdělování) mezi mobilní a stacionární fází. V kapalinové chromatografii je také využíváno principů adsorpce, biospecifické reakce, iontové výměny či síťového efektu [19 – 21].

2.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z angl. „High performance liquid chromatography“) je dnes využívána v každodenní praxi ve většině analytických laboratoří a je nejčastějším instrumentálním uspořádáním kapalinové chromatografie

s tím, že mobilní fáze je přiváděna do systému pomocí bezpulzních čerpadel za vysokého tlaku (až 100 MPa). Vysokých účinností je dosaženo použitím chromatografických kolon, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, vyplňující homogenně kolonu. Stacionární fází může být pevná látka nebo kapalina navázaná na pevném inertním nosiči [19 – 21].

Dnes jsou pro analytické účely používány HPLC kolony obvykle o vnitřním průměru 2,1 až 5 mm a o délce 10 až 300 mm. Kolony jsou naplněny sorbentem obvykle o velikosti částic 2,6 až 5 μm [21]. V posledních letech dochází především k miniaturizaci kolon (mikronáplňové kolony) i celkové instrumentace [20, 21]. Metoda HPLC je nejčastěji využívána k dělení látek ze směsi a k jejich následné identifikaci či ke kvantitativnímu stanovení [21, 22].

2.3.1.1 RP-HPLC ve spojení s DAD detekcí (RP-HPLC-DAD)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních (obrácených) fázích (RP--HPLC, z angl. „Reverse phase-HPLC“) se stala dominantním separačním módem kapalinové chromatografie ve 21. století a postupně nahradila chromatografii na normálních fázích (NP-HPLC, z angl. „Normal phase-HPLC“) [21].

Tento mód kapalinové chromatografie vyžaduje způsob provedení, při kterém je zvolena polární mobilní fáze – obvykle směs vodné složky (voda, zředěná kyselina či báze nebo pufr) s vhodným organickým modifikátorem (rozpouštědlem) mísitelným s vodou (methanol, acetonitril či tetrahydrofuran) a nepolární stacionární fáze. Nepolární stacionární fáze je nejčastěji tvořena chemicky vázanou fází na bázi silikagelu, kdy jsou na nosič chemicky navázány alkylové či arylové řetězce různé délky (C_2 – C_{30}, Ph). Stále nejrozšířenějším sorbentem je alkyl C_{18} chemicky vázaný na silikagelový nosič [21].

Častou nevýhodou je přítomnost volných silanolových skupin na silikagelu. Tyto skupiny zapříčiňují rozmývání píků, zejména při jejich interakci s bazickými látkami. Z tohoto důvodu se využívá tzv. „endcapping“, který snižuje počet volných silanolových skupin. Tento fyzikálně-chemický proces je založen na chemické reakci organochlorsilanu se silanolovými skupinami. Chemickou reakcí dochází k jejich blokaci či stérickému bránění (zaslepení) a k lepší separaci analytů [21].

Retence analyzovaných látek je převážně ovlivněna slabými vazebnými interakcemi mezi stacionární fází a analytem (hydrofobní interakce, van der Waalsovy interakce). U fenylové stacionární fáze je separace zprostředkována hlavně π-π interakcemi a jako modifikátor mobilní fáze je většinou používán methanol. Acetonitril, obsahující násobnou vazbu, může interagovat π-π interakcemi se stacionární fází, a tím podstatně redukovat retenci analytu s násobnými vazbami. Pro separaci v reverzním módu se také používají polymerní stacionární fáze, nejčastěji kopolymery styrenu a divinylbenzenu [21].

Detektory s diodovým polem (DAD, z angl. „Diode array detector“) patří do skupiny fotometrických detektorů umožňujících změření spekter v daném čase, v určitém zvoleném intervalu vlnových délek a pomáhají porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter. S jejich pomocí je také možné vyhodnotit, zda v píku eluuje pouze jedna látka nebo směs nerozdělených analytů [21].

Detektor diodového pole v kombinaci s RP-HPLC umožňuje stanovení až osmi amatoxinů a falotoxinů při jedné chromatografické analýze, vzhledem k jejich rozdílné absorbanci při různých vlnových délkách [4].

2.4 Přímá extrakce

Při metodě přímé extrakce je analyt obvykle extrahován z tuhého vzorku. Tento postup je označován jako extrakce tuhá látka-kapalina. Důležitým krokem, který ovlivňuje účinnost extrakce, je úprava vzorku před samotnou extrakcí. Analyzovaný vzorek by měl být rozmělněn na menší částice (drcením či mletím) a poté homogenizován. Vzorek je tím extrahován rychleji a efektivněji [22].

Pro účinnost extrakce hraje také velkou roli výběr extrakčního činidla. Důležité jsou chemické a fyzikální vlastnosti analyzované látky – rozpustnost, rozdělovací koeficient a další. Většinou se jedná o polární rozpouštědla ve směsi voda-organické rozpouštědlo (methanol, acetonitril, tetrahydrofuran) nebo směsi pufr-organické rozpouštědlo. Methanol a acetonitril jsou zařazovány do rozpouštědel střední polarity, ve kterých se rozpouští většina analytů. Z praktického hlediska se přímá extrakce provádí v uzavřené nádobě s použitím horizontální či rotační třepačky nebo s ultrazvukovou lázní. Výhodou přímé extrakce je jednoduchost a nenáročnost na

laboratorní instrumentaci, avšak nevýhodou je poměrně velká spotřeba rozpouštědel i vzorku nebo také možné ztráty při extrakci, způsobené např. adsorpcí analytu na povrch matrice [22].

Přímá extrakce se využívá pro extrakci různých druhů cyklopeptidů (amatoxinů a falotoxinů), obsažených v muchomůrce zelené (v klobouku, třeni, pochvě ad.), s extrakčním činidlem methanol:voda v poměru 1:1 (*v*/*v*) [4], acetonitril:voda v poměru 6:1 (*v*/*v*) [5] nebo také methanol:voda:kyselina chlorovodíková (c_{HCl} = 0,01 mol·dm^{-3}) v poměru 5:4:1 (*v*/*v*/*v*) [8, 13]. Přímé extrakce je využíváno i pro stanovení α-amanitinu v homogenizovaných jaterních a ledvinných buňkách potkanů [23].

2.5 Extrakce na tuhé fázi

Extrakce na tuhé fázi (SPE, z angl. „Solid-phase extraction“) je dominantní separační technika při extrakci a úpravě vzorků před vlastní chromatografickou analýzou. Mezi její přednosti patří vysoká výtěžnost, účinné zakoncentrování analytu, přečištění vzorku během extrakce a nižší spotřeba organických rozpouštědel ve srovnání s extrakcí kapaliny kapalinou (LLE, z angl. „Liquid-liquid extraction“). Z finančního hlediska je nevýhodou jednorázová použitelnost SPE-kolonek. Metoda SPE spočívá v zadržování analytu na principu rozdělování či jiné interakce mezi dvě nemísitelné fáze, mezi tuhou fází (extrakční kolonka) a kapalnou fází (kapalný vzorek obsahující analyt) [22].

V současné době je dostupnost sorbentů dostačující, nejčastěji se jedná o sorbenty na bázi silikagelu s chemicky vázanými alkyly, např. klasické nepolární C_{18} a C_8, dále polární fáze (např. aminopropyl a diol), iontově-výměnné materiály (katexy a anexy) a různé polymerní materiály [22].

Pro SPE extrakci amatoxinů i falotoxinů v lidské moči, séru a žaludečním obsahu se nejčastěji využívají SPE-kolonky založené na reverzní fázi s elučním krokem, prováděným nejčastěji methanolem [2, 3, 14, 15, 24, 25]. Stanovuje se α- i β-amanitin a různé falotoxiny v lidské moči a séru [2, 14], dále α- a β-amanitin v lidských jaterních buňkách [3] nebo v moči [25] či samotný α-amanitin v lidském séru [24] nebo v moči [15].

2.6 Metody pro stanovení toxinů muchomůrky zelené

Pro separaci studovaných toxinů muchomůrky zelené (amatoxinů a falotoxinů) v biologických materiálech je nejvýhodnější metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie, díky její vysoké citlivosti, přesnosti a rychlé detekci. Přestože plynová chromatografie (GC, z angl. „Gas chromatography“) ve spojení s hmotnostním spektrometrem je nejvíce využívaná v toxikologických analýzách, není vhodná pro stanovení toxinů muchomůrky zelené, konkrétně amatoxinů, vzhledem k jejich značné netěkavosti [3, 24].

Pro RP-HPLC separaci amatoxinů a falotoxinů v biologických materiálech se ve většině případů používá nepolární stacionární fáze C_{18} a jako vodná složka mobilní fáze vodný roztok octanu amonného v kombinaci s organickým modifikátorem – – acetonitrilem [2, 4, 5, 8, 13]. Dále pro separaci samotného α-amanitinu v lidské moči se jako mobilní fáze používá fosfátový pufr v kombinaci s acetonitrilem [15].

Další metody, které se využívají pro identifikaci a stanovení amatoxinů a falotoxinů, jsou:

- Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC, z angl. „Ultra-high performance liquid chromatography“), která je využívána pro stanovení α-, β- -amanitinu a faloidinu [14] a navíc také falacidinu [26] v lidském séru, plazmě a v moči [14, 26]. Dále se stanovují α- a β-amanitin v lidských jaterních buňkách [3] nebo v moči [25].
- Tenkovrstvá chromatografie (TLC, z angl. „Thin-layer chromatography“), která je využívána pro identifikaci α- a β-amanitinu v houbových extraktech [27], dále je možné pomocí TLC identifikovat falotoxiny v tělních tekutinách [28].
- Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC, z angl. „High performance thin-layer chromatography“), kterou se stanovují α-, β- a γ-amanitin v extraktech muchomůrky zelené [29].
- Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC, z angl. „Hydrophilic and ionic interaction liquid chromatography“) je využívána pro stanovení α-, β- a γ- -amanitinu, falacidinu a faloidinu v houbových extraktech [16].
- Kapilární zónová elektroforéza (CZE, z angl. „Capillary zone electrophoresis“), kterou se stanovují α-, β-amanitin, γ-amanitin, faloidin a falacidin v houbových

extraktech [30] nebo také α- a β-amanitin v lidské moči [18].

- Fluorescenční metody, využívané pro stanovení α- a β-amanitinu v extraktech muchomůrky zelené [31].
- Radioimunoanalýza (RIA, z angl. „Radioimmunoassay“), která je využívána pro stanovení amatoxinů (α-, β- a γ-amanitinu) v lidském séru a v moči [32].
- ELISA (z angl. „Enzyme-linked immunosorbent assay“), kterou se stanovuje β--amanitin v lidském séru a v moči [33].
- Polymerasová řetězová reakce (PCR, z angl. „Polymerase chain reaction“), kterou se geneticky detekují požité plodnice muchomůrky zelené na základě jejich sekvence DNA v biologických materiálech [34].

2.6.1 Způsoby detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii záleží na volbě vhodné detekční techniky. Nejvíce používanými detektory pro stanovení toxinů muchomůrky zelené jsou:

- Absorpční fotometrický detektor (UV/VIS, z angl. „Ultraviolet/Visible“) nebo také detektor diodového pole (DAD). Stanovují se jimi α-, β-amanitin, faloidin, falacidin (a další) v extraktech různých druhů muchomůrek [4, 5, 8, 13]. Existuje i metoda pro stanovení samotného α-amanitinu v lidském séru [24].
- Hmotnostní spektrometr (MS, z angl. „Mass spectrometer“). Ve spojení s HPLC je vysoce citlivá, výkonná a spolehlivá metoda, obecně aplikovatelná pro stanovení toxinů známých i méně známých druhů muchomůrek. Konkrétně je využívána pro stanovení α-, β-amanitinu, faloidinu, falacidinu (a dalších) v extraktech různých druhů muchomůrek [4, 5, 35] nebo v lidském séru a v moči [2].
- Elektrochemická detekce, přesněji coulometrická detekce. Ve spojení s HPLC se v současné době, vzhledem k vysoké selektivitě a citlivosti, dostává do popředí a využívá se pro stanovení samotného α-amanitinu v jaterních a ledvinných buňkách potkanů [23] nebo v lidské moči [15].

2.7 Vyhodnocení chromatografických analýz

Pro hodnocení kolikrát více času stráví analyt ve stacionární fázi než v mobilní fázi (tzv. míra retence dělených látek) je používán retenční faktor *k* a lze ho vypočítat podle rovnice č. 1 [19 – 21],

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

kde t_R je retenční čas, tj. doba od nástřiku analyzované látky do zaznamenání píku detektorem a t_M je mrtvý čas, tj. retenční čas analytu, který není zadržován na stacionární fázi, a pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze.

Pro hodnocení vzájemné retence dvou analytů je využíván separační faktor α (selektivita) jako poměr retenčních faktorů obou analytů (viz rovnice č. 2) [19 – 21],

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

Parametr rozlišení $R_{1,2}$ se využívá pro hodnocení vzájemného oddělení dvou analytů. Pro píky analytů (č. 1 a 2) je rozlišení charakterizováno rovnicí č. 3,

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

kde $t_{R,1}$ a $t_{R,2}$ jsou retenční časy analytů (č. 1 a 2) a w_1 a w_2 jsou odpovídající šířky píků při základnách [19 – 21].

2.8 Vyhodnocení extrakčních analýz na tuhé fázi

Pro správné vyhodnocení výsledků extrakčních analýz na tuhé fázi je nutné definovat rovnici č. 4 pro výpočet výtěžnosti (účinnosti) extrakce na tuhé fázi *R*,

$$R\ [\%] = \frac{\text{plocha píku analytu před SPE}}{\text{plocha píku analytu po SPE}} \cdot \frac{V_{\text{reálný vzorek}}}{V_{\text{eluční činidlo}}} \cdot 100 \qquad (4)$$

Podle této rovnice byly vypočítány všechny SPE výtěžnosti studovaných analytů (viz kap. 4.3 a 4.5).

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

K přípravě mobilních fází pro chromatografické analýzy byl použit:

- acetonitril (99,99%, Fluka Analytical, Německo).
- methanol (≥ 99,9% (HPLC), Sigma-Aldrich, Německo).
- octan amonný (p.a., Penta, Česká republika).
- mravenčí kyselina (98 – 100% p.a., Riedel-de Haën, Německo).
- deionizovaná voda (vodivost 1,85 μS, Milli-Q Millipore, Bedford, USA).

Pro přípravu standardních roztoků studovaných toxinů byly použity:

- α-amanitin (≥ 90% (HPLC), Sigma-Aldrich, Německo).
- β-amanitin (~ 90% (HPLC), Sigma-Aldrich, Německo).
- falacidin (≥ 85%, Sigma-Aldrich, Německo).
- faloidin (≥ 90%, Sigma-Aldrich, Německo).
- methanol (≥ 99,9 % (UHPLC-MS), Fluka Analytical, Německo).

K přípravě reálných vzorků byly použity klobouky z plodnic muchomůrky zelené nasbírané v lokalitě Praha 5-Chuchle, dodané RNDr. Janem Borovičkou, Ph.D. z Ústavu jaderné fyziky AV ČR, v.v.i. a z Geologického ústavu AV ČR, v.v.i.. Jako chemikálie k této přípravě byly použity:

- methanol (≥ 99,9 % (HPLC), Sigma-Aldrich, Německo).
- octan amonný (p.a., Penta, ČR).
- mravenčí kyselina (98 – 100% p.a., Riedel-de Haën, Německo).
- deionizovaná voda (vodivost 1,85 μS, Milli-Q Millipore, Bedford, USA).

K přípravě extrakčního činidla pro přímou extrakci studovaných toxinů z klobouků muchomůrky zelené byly použity stejné chemikálie jako u přípravy reálných vzorků s výjimkou octanu amonného.

K přípravě elučního činidla pro SPE extrakci a k aktivaci SPE-kolonky byl použit methanol (≥ 99,9 % (HPLC), Sigma-Aldrich, Německo).

3.2 Instrumentace

K chromatografickým analýzám byl využíván vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent serie 1260 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) složený z:

- vysokotlaké pumpy (Agilent Technologies, 1260 Infinity).
- termostatovaného automatického dávkovače (Agilent Technologies, 1260 Infinity).
- kolonového termostatu (Agilent Technologies, 1200 Series).
- detektoru diodového pole (Agilent Technologies, 1200 Series).

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

Naměřená data byla vyhodnocena v programu Agilent OpenLab CDS ChemStation (Agilent Technologies) a v programu OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, USA).

Potřebné navážky octanu amonného byly zváženy na předvážkách ADAM HCB 1002 (P-LAB, Česká republika).

Klobouky muchomůrky zelené i standardy byly zváženy na analytických vahách APX-100 (P-LAB, Česká republika).

Hodnoty pH mobilních fází byly změřeny pomocí pH metru 3540 Combined pH & Conductivity (Jenway, Velká Británie).

Všechny extrakce na tuhé fázi byly provedeny na SPE-kolonce Supel-Select HLB (Sigma-Aldrich, Německo) o objemu 3 ml s obsahem 60 mg sorbentu (na bázi polystyrenu) s pomocí prekoncentrátoru 570-30 Visiprep SPE Vakuum Manifold (Sigma-Aldrich, Německo) a vakuové výměny (KNF lab, Francie).

Pro přímou extrakci byl použit ultrazvuk LC30H (P-LAB, Česká republika) a rotační třepačka Orbital Shaker-Incubator ES-20 (Biosan, Litva).

Pro filtraci přímých extraktů z muchomůrky zelené byly použity stříkačkové mikrofiltry Corning (0,45 μm, Corning Incorporated, Německo).

K odpařování methanolu z přímých extraktů byl používán blokový ohřívač (Grant, Velká Británie).

3.3 Příprava vodné složky mobilní fáze

Jako vodná složka mobilní fáze byl připraven vodný roztok octanu amonného, jehož pH bylo následně upravováno kyselinou mravenčí.

3.4 Příprava standardních roztoků pro optimalizaci HPLC

Pro optimalizaci HPLC byly připraveny standardní methanolické roztoky α-amanitinu, β-amanitinu a faloidinu o koncentraci 1 $mg \cdot ml^{-1}$. Tyto připravené standardní roztoky byly následně pětkrát zředěny methanolem na koncentraci 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Standardní methanolický roztok falacidinu byl již dodán o koncentraci 1 $mg \cdot ml^{-1}$ a byl také následně zředěn methanolem na 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Pomocí těchto roztoků byl připraven směsný standard tří analytů (α-amanitinu, β-amanitinu a faloidinu) o společné koncentraci 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$ a směsný standard všech čtyř analytů (α-amanitinu, β-amanitinu, faloidinu a falacidinu**)** o společné koncentraci 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$.

3.5 Příprava standardních roztoků pro optimalizaci SPE

Pro optimalizaci SPE extrakce byl připraven okyselující roztok kyseliny mravenčí, a to ředěním deionizovanou vodou v poměru 1:1 (*v*/*v*).

Byly připraveny dva standardní roztoky α-amanitinu o koncentraci 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$, první bez přidané kapky okyselujícího roztoku kyseliny mravenčí, druhý s přidanou kapkou okyselujícího roztoku, stejný postup byl proveden i u přípravy dvou roztoků β--amanitinu o koncentraci 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$ (bez okyselení a s okyselením). Dále byl připraven směsný roztok α-amanitinu a β-amanitinu o společné koncentraci 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$ s přidanou kapkou okyselujícího roztoku kyseliny mravenčí. Pak byl připraven směsný roztok falacidinu a faloidinu o společné koncentraci 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$ bez přidané kapky a s přidanou kapkou okyselujícího roztoku kyseliny mravenčí. Poté byly připraveny směsné roztoky všech čtyř sledovaných analytů (α-amanitinu, β-amanitinu, faloidinu a falacidinu) o společné koncentraci v rozmezí 10 – 40 $\mu g \cdot ml^{-1}$ s přidanou kapkou okyselujícího roztoku kyseliny mravenčí.

3.6 Přímá extrakce toxinů muchomůrky zelené

K přímé extrakci čtyř sledovaných toxinů byly vybrány dva zmražené klobouky muchomůrky zelené, jeden mladší klobouk a druhý střední velikosti se sklenutým okrajem klobouku. Jako extrakční činidlo byla zvolena směs 0,1% vodného roztoku kyseliny mravenčí a methanolu v poměru 1:1 (*v*/*v*). Zmražené klobouky o celkové hmotnosti 25,55 g byly rozkrájeny nožem na menší kousky a umístěny do 150ml extrakční nádoby (kádinky) a bylo k nim přidáno 36 ml extrakčního činidla. Extrakční nádoba byla uzavřena parafilmem a umístěna do ultrazvukové lázně po dobu 28 minut a pak vložena na rotační třepačku (160 RPM, 37 °C, 20 hodin). Po ukončení třepání byla kapalná složka extraktu odebrána a přefiltrována přes stříkačkové mikrofiltry (0,45 μm), čímž byl získán potřebný extrakt pro HPLC-DAD analýzy.

3.7 Příprava reálných vzorků pro analýzy

Z extraktu vzniklého přímou extrakcí byl odebrán 1 ml do první zkumavky (Eppendorf), která byla s otevřeným víčkem umístěna do blokového ohřívače. Při teplotě 95 °C byl roztok odpařen. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml deionizované vody nebo deionizované vody s přidanou kapkou okyselujícího roztoku a následně analyzován optimalizovanou HPLC-DAD metodou. Do druhé zkumavky bylo odebráno 250 μl extraktu a po odpaření roztoku byl odparek rozpuštěn také v 1 ml deionizované vody, tím byl získán čtyřikrát zředěný čistě vodný extrakt. Tento odparek byl také analyzován optimalizovanou HPLC-DAD metodou.

Připravená SPE-kolonka byla nejprve aktivována 1 ml deionizované vody a 1 ml methanolu, následně byla promyta 2 – 3 ml deionizované vody pro extrakční úpravu prostředí. Po analýze HPLC-DAD byl 1 ml odparku nanesen na kolonku a eluován 0,5 ml methanolu a pro určení výtěžnosti SPE extrakce všech analytů v odparku znovu chromatograficky analyzován.

Pro metodu standardního přídavku (tzv. spike, viz kap. 3.8) byl extrakt o objemu 0,6 ml čtyřikrát zředěn mobilní fází o složení: 1 mmol·dm^{-3} vodný roztok octanu amonného o pH 3,33 (složka A) a methanol (složka B) v poměru 55:45 (*v*/*v*).

3.8 Kvalitativní hodnocení

Kvalitativní hodnocení analýz bylo nejprve provedeno porovnáváním retenčních časů separovaných látek v přímém extraktu s retenčními časy standardních roztoků α-amanitinu, β-amanitinu, falacidinu a faloidinu.

Dále pro kvalitativní analýzu čtyř sledovaných analytů bylo do 250 µl extraktu, čtyřikrát zředěného mobilní fází, přidáno 50 µl směsného standardu všech čtyř analytů (koncentrace každého 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$). Paralelně bylo do 250 µl extraktu, čtyřikrát zředěného mobilní fází, přidáno pouze 50 µl deionizované vody. Složení mobilní fáze pro ředění přímého extraktu bylo: 1 $mmol \cdot dm^{-3}$ vodný roztok octanu amonného o pH 3,33 (složka A) a methanol (složka B) v poměru 55:45 (*v*/*v*).

4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace HPLC-DAD separace

V procesu optimalizace chromatografické separace bylo vycházeno z diplomové práce Mgr. Karla Musila [36]. Pro hledání optimálních separačních podmínek sledovaných toxinů (α-amanitin, β-amanitin, falacidin a faloidin) byly vybrány jejich připravené standardní roztoky a směsné standardní roztoky o různých koncentracích. Pro separaci byla použita kolona Zorbax SB-Phenyl (250 × 4,6 mm; 5 μm). Všechna data byla měřena za podmínek isokratické eluce. Přejaté podmínky měření byly následující:

- dávkovací objem vzorku: $V = 1{,}0$ μl
- objemová průtoková rychlost mobilní fáze: $F_m = 0{,}8$ ml·ml^{-1}
- teplota autosampleru: $T = 25$ °C
- termostatování kolony: $T = 35$ °C
- vlnová délka na detektoru: $\lambda = 295$ nm

4.1.1 Výběr vhodného organického modifikátoru mobilní fáze

Jako mobilní fáze byla zvolena směs organického modifikátoru a vodného roztoku octanu amonného o pH 3,33 (složka A). Jako organický modifikátor byl zkoušen acetonitril a methanol (složka B) a koncentrace vodného roztoku octanu amonného se pohybovala v rozmezí 1 – 10 mmol·dm^{-3}.

Nejprve byly proměřeny retenční časy všech standardních roztoků analytů v mobilních fázích s acetonitrilem jako organickým modifikátorem v rozmezí 20 – 40 obj. % acetonitrilu. Koncentrace vodného roztoku octanu amonného byla 1 mmol·dm^{-3}.

Z výsledků měření vyplynulo, že při použití acetonitrilu jako organického modifikátoru mobilní fáze dochází k velmi rychlé eluci analytů (i za jeho nižšího obsahu) a analyty, zejména oba amanitiny, eluují blízko mrtvého času (viz tabulka 1). V reverzním separačním módu platí, že se vzrůstajícím obsahem organického modifikátoru v mobilní fázi dochází ke zkrácení retence analyzovaných látek. Nejnižší retenci vykazoval β-amanitin a nejvyšší faloidin. Výraznějšího rozdílu v retenci

sledovaných analytů bylo dosaženo v mobilních fázích s obsahem acetonitrilu okolo 20 obj. % a jako nejvhodnější se jevil obsah 21 obj. %, tj. poměr 79:21 (*v*/*v*) – vodná složka:acetonitril.

K velmi krátké retenci analytů přispívá v případě použité Zorbax SB-Phenyl kolony i to, že acetonitril má ve své struktuře násobnou vazbu, která může poskytovat π-π interakce s navázaným fenylem, a tím konkurovat vazbě analyt-stacionární fáze.

Tabulka 1. Naměřené retenční časy t_R [min] β-amanitinu, α-amanitinu, falacidinu a faloidinu s použitím mobilní fáze o složení: 1 mmol·dm^{-3} vodný roztok octanu amonného o pH 3,33 (složka A) a acetonitril jako organický modifikátor (složka B).

mobilní fáze A:B	β-amanitin	α-amanitin	falacidin	faloidin
60:40	2,73	2,94	3,00	3,02
70:30	3,15	3,26	4,00	4,18
75:25	3,90	4,02	5,50	5,72
77:23	4,00	4,42	6,73	6,96
78:22	4,15	4,67	7,64	7,87
79:21	4,38	4,99	8,74	8,95
80:20	4,66	5,35	10,17	10,40

Vzhledem ke krátké retenci zejména amanitinů v mobilních fázích s acetonitrilem, byl jako druhý organický modifikátor zvolen methanol a byly proměřeny retenční časy všech čtyř standardních roztoků analytů v mobilní fázi: 1 mmol·dm^{-3} octan amonný o pH 3,33 s obsahem 40 – 70 obj. % methanolu.

Při použití methanolu jako organického modifikátoru byl pozorován významnější rozdíl v retenci sledovaných analytů již při 50 obj. % methanolu, který se prohluboval se snižujícím se obsahem methanolu (viz tabulka 2). Jako nejvhodnější (z hlediska retenčních časů, rozlišení, symetrie píků a separační účinnosti) byla zvolena mobilní fáze s 45 obj. % methanolu a při tomto obsahu methanolu byl dále sledován vliv koncentrace octanu amonného na separační chování sledovaných analytů.

Tabulka 2. Naměřené retenční časy t_R [min] β-amanitinu, α-amanitinu, falacidinu a faloidinu s použitím mobilní fáze o složení: 1 mmol·dm^{-3} vodný roztok octanu amonného o pH 3,33 (složka A) a methanol jako organický modifikátor (složka B).

mobilní fáze A:B	β-amanitin	α-amanitin	falacidin	faloidin
30:70	3,06	3,41	3,51	3,79
40:60	3,26	3,63	4,14	4,52
50:50	3,81	4,27	6,16	6,81
55:45	4,32	4,90	8,51	9,46
60:40	5,15	5,95	12,99	14,57

Byly připraveny vodné roztoky octanu amonného o pH 3,33 a o koncentracích 5 a 10 mmol·dm^{-3} – získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Z výsledků měření je zřejmé, že tyto proměřované koncentrace octanu amonného nemají na separaci prakticky žádný vliv, a proto byl nadále používán 1 mmol·dm^{-3} vodný roztok octanu amonného.

Tabulka 3. Naměřené retenční časy t_R [min] β-amanitinu, α-amanitinu, falacidinu a faloidinu s použitím mobilní fáze o složení: vodný roztok octanu amonného (pH = 3,33) o jeho různých koncentracích a methanolu v poměru 55:45 (*v*/*v*).

c (octan amonný) [mmol·dm^{-3}]	β-amanitin	α-amanitin	falacidin	faloidin
1	4,32	4,90	8,51	9,46
5	4,43	4,90	8,55	9,45
10	4,46	4,89	8,48	9,37

4.1.2 Výběr pH vodné složky mobilní fáze

Pro optimalizaci pH vodné složky mobilní fáze 1 mmol·dm^{-3} vodný roztok octanu amonného:methanol v poměru 55:45 (*v*/*v*) bylo pH octanu amonného upravováno mravenčí kyselinou v rozmezí hodnot pH 2,70 – 3,90. Naměřené retenční časy sledovaných analytů jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4. Naměřené retenční časy t_R [min] β-amanitinu, α-amanitinu, falacidinu a faloidinu s použitím mobilní fáze o složení: 1 mmol·dm^{-3} vodný roztok octanu amonného o jeho různých hodnotách pH a methanol v poměru 55:45 (*v*/*v*).

pH	β-amanitin	α-amanitin	falacidin	faloidin
2,70	4,78	4,88	9,58	9,36
3,00	4,70	4,90	9,46	9,42
3,33	4,32	4,90	8,51	9,46
3,40	4,50	4,91	8,72	9,51
3,50	4,31	4,91	8,43	9,56
3,60	4,07	4,94	7,74	9,56
3,90	3,78	4,89	6,62	9,42

V testovaných mobilních fázích s rozdílnou hodnotou pH vodné složky se projevilo acidobazické chování sledovaných analytů, a to β-amanitinu a falacidinu. β-amanitin ve své struktuře obsahuje kyselou karboxylovou skupinu, vázanou v pozici R^3 (viz obr. 3). Tato skupina podléhá disociaci, takže při nižší hodnotě pH je méně disociovaná, a tudíž více zadržovaná na nepolární stacionární fázi. Volbou vhodného pH pufru lze tak ovlivňovat retenci β-amanitinu, zatímco retence α-amanitinu, který má v pozici R^3 amid, zůstává ve sledovaném rozsahu pH prakticky konstantní. Volbou vhodné hodnoty pH lze tak dosáhnout toho, aby na jedné straně β-amanitin neeluoval příliš rychle, blízko mrtvého času, a na druhé straně bylo dosaženo jeho dostatečného rozlišení od α-amanitinu. Falacidin ve své struktuře také obsahuje kyselou karboxylovou skupinu v pozici R^4 (viz obr. 4), takže lze jeho retenci ovlivňovat podobně jako u β-amanitinu.

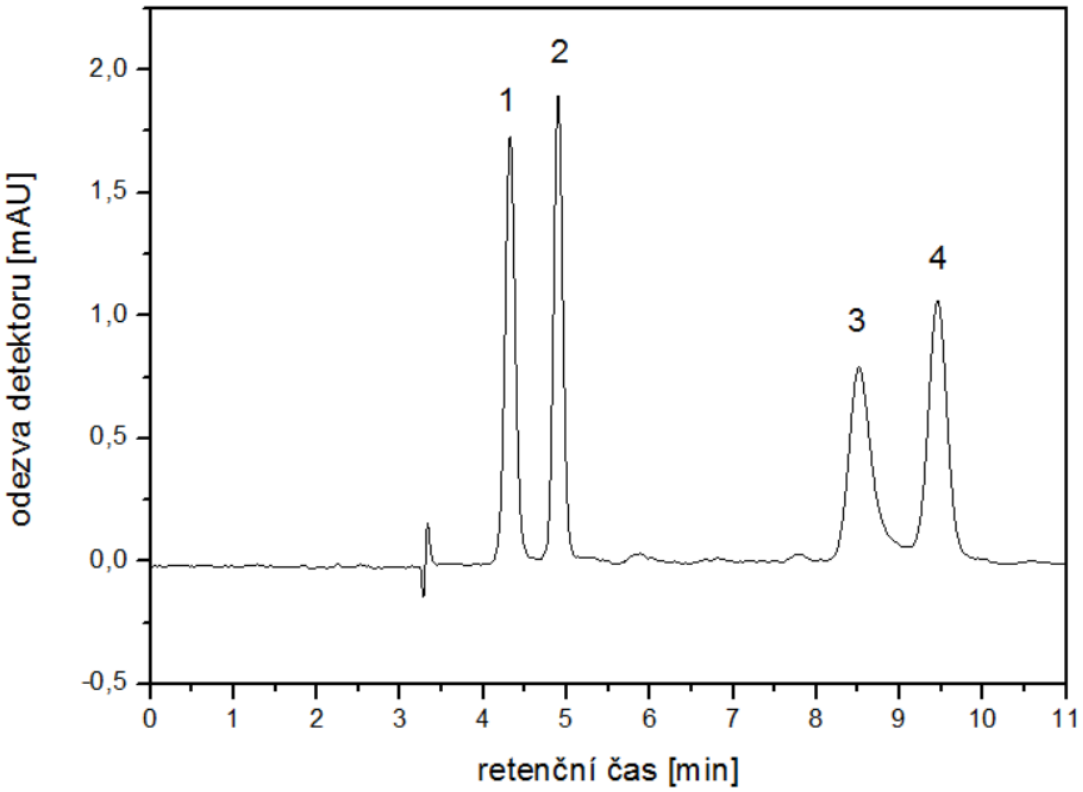
Z tabulky 4 je vidět, že při hodnotách pH 2,70 a 3,00 vykazovaly oba amatoxiny i falacidin nejvyšší retenci, která však nevedla k rozdělení dvojice amatoxinů ani dvojice falotoxinů, dále u těchto hodnot pH došlo ke vzájemnému prohození elučního pořadí falacidinu a faloidinu.

Jako vhodné pH vodné složky mobilní fáze se jevil interval pH 3,30 – 3,50. V rozmezí pH 3,50 – 3,90 vykazovaly oba amanitiny nízkou retenci, opět nedovolující jejich rozlišení.

Z naměřených dat vyplývá, že pro separaci sledovaných analytů je nejvhodnější hodnota pH vodné složky mobilní fáze 3,33. Na základě získaných výsledků

optimalizační studie bylo jako nejvhodnější složení mobilní fáze vybráno: 1 mmol·dm^{-3} vodný roztok octanu amonného o pH 3,33 (složka A) a methanol (složka B) v poměru 55:45 (*v*/*v*).

Na obr. 5 je pro ilustraci ukázán chromatogram směsného roztoku standardů sledovaných toxinů o společné koncentraci 20 µg·ml^{-1}, získaný ve výše uvedené mobilní fázi. Z obr. 5 je vidět, že sledované analyty jsou rozděleny až na základní linii.



Obr. 5. Chromatogram směsi čtyř standardů (1. β-amanitin, 2. α-amanitin, 3. falacidin, 4. faloidin) o koncentraci každého analytu 20 µg·ml^{-1}. Mobilní fáze obsahovala 1 mmol·dm^{-3} vodný roztok octanu amonného o pH 3,33 (složka A) a methanol (složka B) v poměru 55:45 (*v*/*v*), průtok mobilní fáze byl 0,8 ml·min^{-1} s detekcí DAD při vlnové délce 295 nm.

Z chromatogramu (obr. 5) získaného za optimalizovaných separačních podmínek byly vypočteny retenční a separační charakteristiky, které jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5. Retenční časy analytů (t_R), hodnoty jejich retenčních faktorů (k), separačních faktorů (α) a hodnoty rozlišení sousedních píků ($R_{1,2}$) získané z chromatogramu směsi čtyř standardů o koncentraci každého analytu 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$ (t_M = 3,30 minut).

číslo píku	analyt	t_R [min]	k	α	$R_{1,2}$
1.	β-amanitin	4,32	0,31	---	---
2.	α-amanitin	4,90	0,48	1,57	2,58
3.	falacidin	8,51	1,58	3,26	9,76
4.	faloidin	9,46	1,87	1,18	2,00

4.2 Optimalizace přímé extrakce

V procesu optimalizace přímé extrakce se vycházelo z diplomové práce Mgr. Karla Musila [36].

Vzhledem k plánované SPE extrakci nelze na SPE-kolonku s reverzní stacionární fází nanášet methanolický extrakt, protože methanol se používá jako eluční činidlo. Extrakce byla provedena směsí 0,1% vodného roztoku kyseliny mravenčí a methanolu v poměru 1:1 (*v*/*v*). Extrakt bylo nutné odpařit v blokovém ohřívači, který byl nastaven na 95 °C, a odparek pak znovu rozpustit pouze v deionizované vodě. Elučním činidlem pro následnou SPE extrakci byl zvolen methanol a jakákoliv jeho přítomnost v přímém extraktu by byla nežádoucí. V odborné literatuře se nejčastěji jako zdroj odpařování methanolu do sucha používá proud inertního plynu (dusíku) [2, 3, 24, 25], ale v této bakalářské práci bylo vyzkoušeno odpařování methanolu z přímého extraktu na blokovém ohřívači i z důvodu vyšší teplotní stability sledovaných toxinů.

4.3 Optimalizace extrakce na tuhé fázi

Pro optimalizační SPE studii byla použita optimalizovaná HPLC-DAD metoda (1 $mmol \cdot dm^{-3}$ vodný roztok octanu amonného o pH 3,33 (složka A) a methanol (složka B) v poměru 55:45 (*v*/*v*)).

Pro zjištění, za jakých podmínek dochází k co nejlepší extrakci pomocí SPE, byl zvolen následující přístup. Nejprve byly připraveny vodné roztoky jednotlivých standardů o objemech 1 ml pro SPE a na přístroji HPLC-DAD byly změřeny příslušné

plochy píků. Následně byly tyto roztoky promyty SPE-kolonkou a eluovány 0,5 ml methanolu, čímž by teoreticky pro dosažení 100% SPE výtěžnosti každého analytu (podle rovnice č. 4) měly být příslušné plochy píků po eluci dvakrát vyšší než před elucí. Tento způsob byl aplikován u roztoků α-amanitinu a β-amanitinu o koncentracích 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$.

Zjištěná výtěžnost SPE extrakce pro oba analyty je uvedena v tabulce 6 a je z ní vidět, že hlavně pro β-amanitin byla dosažena nižší výtěžnost. Vzhledem k přítomnosti karboxylové skupiny byl vodný roztok β-amanitinu o koncentraci 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$ okyselen přidanou kapkou okyselujícího roztoku kyseliny mravenčí ve snaze potlačit disociaci karboxylové skupiny, snížit tak polaritu β-amanitinu a zlepšit jeho zadržení na nepolární SPE-kolonce. Jak je vidět z tabulky 6, po okyselení došlo k výraznému zvýšení ve výtěžnosti β-amanitinu a také výtěžnost α-amanitinu byla velmi dobrá.

Tabulka 6. Výtěžnosti SPE extrakce získané pro vodné roztoky standardů α-amanitinu a β-amanitinu o koncentraci c = 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$ (eluce 0,5 ml methanolu).

analyzovaný standardní roztok	R [%]
β-amanitin	76,0
α-amanitin	109,2
β-amanitin s kapkou okyselujícího roztoku kyseliny mravenčí	97,8
α-amanitin s kapkou okyselujícího roztoku kyseliny mravenčí	103,5

Pro budoucí analýzy bylo potřebné zjistit, jaký vliv bude mít α-amanitin ve společném prostředí s β-amanitinem a okyselujícím roztokem kyseliny mravenčí. Proto byl analyzován jejich připravený směsný roztok o společné koncentraci 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$.

Podle výsledků ploch z chromatografických analýz bylo zjištěno, že α-amanitin nemá žádný vliv na separaci β-amanitinu v kyselém prostředí okyselujícího roztoku kyseliny mravenčí, tzn., oba analyty měly velmi dobrou SPE výtěžnost (viz tabulka 7). Připravený směsný roztok falacidinu a faloidinu o společné koncentraci 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$ vykazoval po přidané kapce okyselujícího roztoku také velmi dobrou výtěžnost, podstatně lepší, než v případě čistě vodného roztoku (viz tabulka 7).

Tabulka 7. Výtěžnosti SPE extrakce získané pro směsné standardy dvojic analytů o společné koncentraci každého analytu $c = 20\ \mu g \cdot ml^{-1}$ (eluce 0,5 ml methanolu).

analyzovaný směsný standard	analyt ze směsného standardu	*R* [%]
α-amanitin + β-amanitin s kapkou okyselujícího roztoku kyseliny mravenčí	α-amanitin	98,6
	β-amanitin	99,3
falacidin + faloidin, čistě vodný roztok	falacidin	64,9
	faloidin	91,7
falacidin + faloidin s kapkou okyselujícího roztoku kyseliny mravenčí	falacidin	103,8
	faloidin	112,9

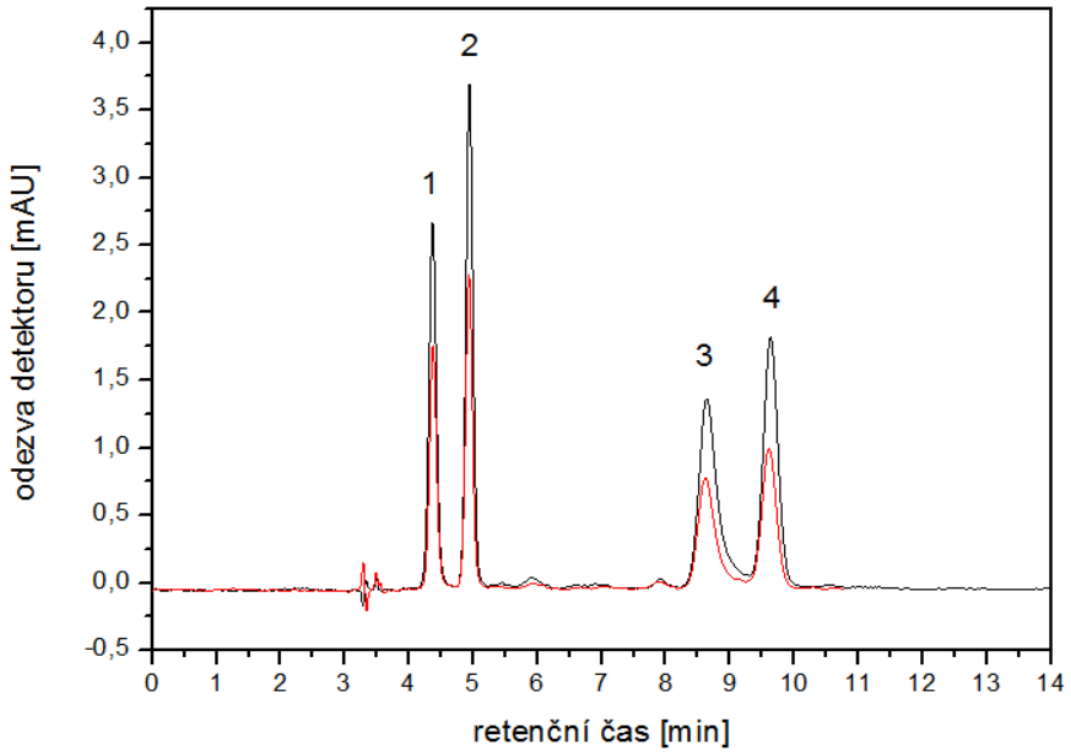
V závěru optimalizace SPE extrakce byly analyzovány směsné standardy čtyř analytů (α-amanitinu, β-amanitinu, faloidinu a falacidinu) o společné koncentraci 10; 20 a 40 $\mu g \cdot ml^{-1}$ okyselené kapkou okyselujícího roztoku kyseliny mravenčí (viz tabulka 8).

Výtěžnost SPE extrakce u směsi standardů o společné koncentraci 40 $\mu g \cdot ml^{-1}$ je nižší než u společné koncentrace 10 a 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Důvodem může být již částečné vysycení adsorpčních míst kolonky s gramáží 60 mg.

Tabulka 8. Výtěžnosti SPE extrakce *R* [%] z analýzy směsi standardů α-amanitinu, β-amanitinu, faloidinu a falacidinu o společných koncentracích 10; 20 a 40 $\mu g \cdot ml^{-1}$ (eluce 0,5 ml methanolu).

číslo	analyt	$c = 10\ \mu g \cdot ml^{-1}$	$c = 20\ \mu g \cdot ml^{-1}$	$c = 40\ \mu g \cdot ml^{-1}$
1.	β-amanitin	77,8	77,6	68,5
2.	α-amanitin	79,6	79,8	66,6
3.	falacidin	92,8	90,5	88,2
4.	faloidin	89,1	91,5	87,4

Chromatogram 1 ml směsi standardů všech čtyř sledovaných toxinů (o společné koncentraci 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$) před SPE a po SPE extrakci 0,5 ml methanolu je znázorněn na obrázku 6 a je z něho vidět, že sledované analyty jsou rozděleny až na základní linii.



Obr. 6. Chromatogramy směsi čtyř standardů (1. β-amanitin, 2. α-amanitin, 3. falacidin, 4. faloidin) o společné koncentraci 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Červený chromatogram patří směsi před SPE a černý po SPE extrakci. Mobilní fáze obsahovala 1 $mmol \cdot dm^{-3}$ vodný roztok octanu amonného o pH 3,33 (složka A) a methanol (složka B) v poměru 55:45 (*v*/*v*), průtok mobilní fáze byl 0,8 $ml \cdot min^{-1}$ s detekcí DAD při vlnové délce 295 nm.

Extrakce SPE byly provedeny za následujících podmínek: 1 ml vodného vzorku byl dávkován po dobu 1 minuty a 30 sekund a eluce 0,5 ml methanolu probíhala 1 minutu.

4.4 Kvalitativní hodnocení

Pro kvalitativní hodnocení čtyř sledovaných analytů v přímém extraktu bylo použito tzv. spikování (viz tabulka 9), při němž byly porovnány chromatogramy získané analýzou:

a) 250 µl extraktu, čtyřikrát zředěného mobilní fází, s přídavkem 50 µl deionizované vody.
b) 250 µl extraktu, čtyřikrát zředěného mobilní fází, s přídavkem 50 µl směsného standardu čtyř analytů o společné koncentraci 20 $\mu g \cdot ml^{-1}$.

V extraktu byly identifikovány všechny čtyři sledované toxiny, píky analyzovaných látek byly očíslovány a identita analytů byla určena v tomto pořadí: 1. β-amanitin, 2. α--amanitin, 3. falacidin a 4. faloidin.

4.5 Výtěžnosti extrakce na tuhé fázi pro reálné vzorky

K odparku nezředěného a čtyřikrát zředěného čistě vodného extraktu byl přidán 1 ml deionizované vody nebo deionizované vody s přidanou kapkou okyselujícího roztoku a tento roztok byl následně analyzován optimalizovanou HPLC-DAD metodou. Po analýze HPLC-DAD byl 1 ml odparku nanesen na SPE-kolonku a eluován 0,5 ml methanolu a pro určení výtěžnosti SPE v odparku znovu chromatograficky analyzován.

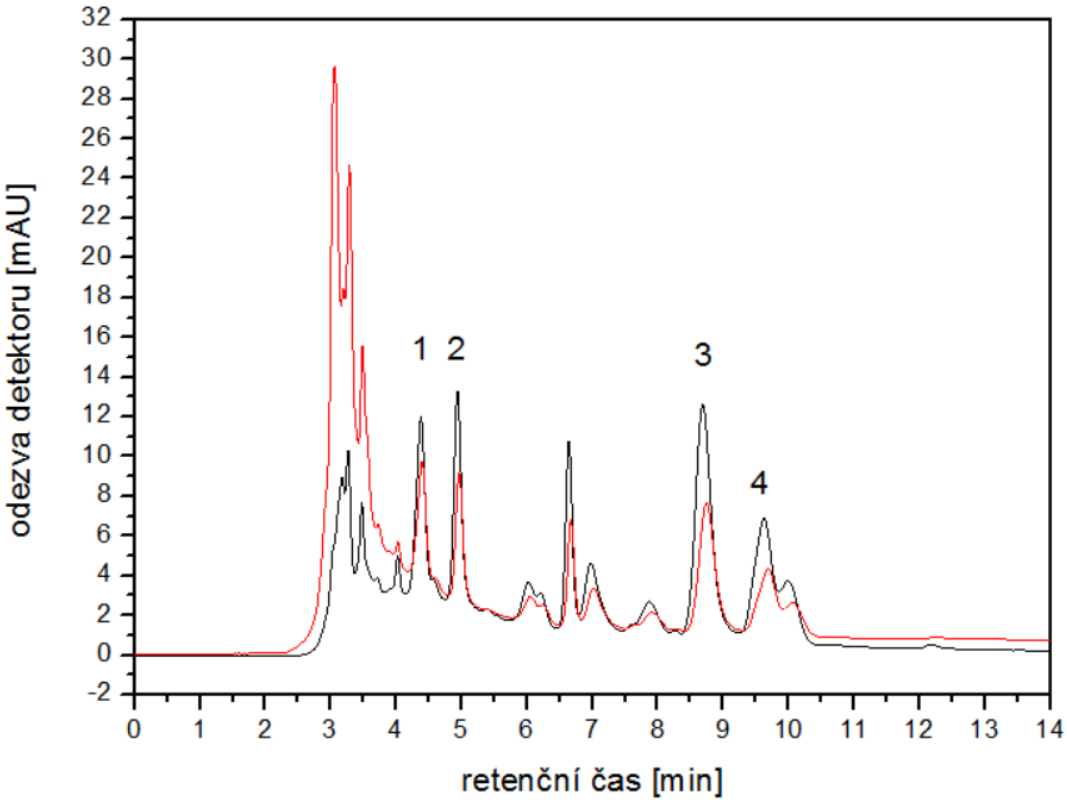
Extrakce SPE reálných vzorků byly provedeny za následujících podmínek: 1 ml vodného vzorku byl dávkován po dobu 1 minuty a 30 sekund a eluce 0,5 ml methanolu probíhala 1 minutu.

Všechny sledované analyty měly velmi dobrou výtěžnost (viz tabulka 9). Ještě lepších výtěžností SPE by mohlo být pravděpodobně dosaženo časově delším elučním krokem nebo změnou poměru objemů dávkovaného vzorku a elučního činidla. K tomu může přispět i vyšší doba odpařování. Při nižší době odpařování by mohlo na stěnách či na dně zkumavky zůstat po odpařování velmi omezené množství methanolu, které by rušilo extrakci.

Tabulka 9. Výtěžnosti SPE extrakce získané z analýzy nezředěného a čtyřikrát zředěného extraktu (eluce 0,5 ml methanolu).

analyt	*R* pro nezředěný extrakt [%]	*R* pro čtyřikrát zředěný extrakt [%]
β-amanitin	85,5	102,2
α-amanitin	82,4	64,5
falacidin	94,1	94,1
faloidin	79,0	84,6

Chromatogram nezředěného čistě vodného extraktu extrahovaného směsí 0,1% vodného roztoku kyseliny mravenčí a methanolu v poměru 1:1 (*v*/*v*) je znázorněn na obr. 7.



Obr. 7. Chromatogram nezředěného čistě vodného extraktu s následujícím pořadím analytů: 1. β-amanitin, 2. α-amanitin, 3. falacidin, 4. faloidin. Červený chromatogram patří extraktu před SPE a černý po SPE extrakci. Mobilní fáze obsahovala 1 mmol·dm^{-3} vodný roztok octanu amonného o pH 3,33 (složka A) a methanol (složka B) v poměru 55:45 (*v/v*), průtok mobilní fáze byl 0,8 ml·min^{-1} s detekcí DAD při vlnové délce 295 nm.

Z obr. 7 je vidět, že plocha nejvyššího píku neznámé látky nebo více látek, v oblasti retenčních časů 3 – 4 minut (oblast mrtvého retenčního času), se po SPE snížila na třetinu své původní velikosti a naopak došlo ke zvýšení ploch píků všech studovaných toxinů.

Z chromatogramu nezředěného extraktu (obr. 7, červená čára) byly vypočteny retenční a separační charakteristiky, které jsou uvedeny v tabulce 10. Z porovnání tabulky 5 a 10 je vidět, že retenční a separační charakteristiky sledovaných toxinů zůstaly v případě extraktu obdobné jako pro směsný vodný roztok standardů, a jsou tedy plně vyhovující.

Tabulka 10. Retenční časy analytů (t_R), hodnoty jejich retenčních faktorů (k), separačních faktorů (α) a hodnoty rozlišení sousedních píků ($R_{1,2}$) získané z chromatogramu pro nezředěný čistě vodný extrakt před elucí SPE (t_M = 3,30 min).

číslo píku	analyt	t_R [min]	k	α	$R_{1,2}$
1.	β-amanitin	4,40	0,33	---	---
2.	α-amanitin	4,96	0,50	1,51	2,04
3.	falacidin	8,75	1,65	3,28	11,31
4.	faloidin	9,69	1,94	1,17	2,00

5 Závěr

HPLC separace studovaných toxinů probíhala na reverzní fázi za podmínek isokratické eluce a s detekcí diodovým polem (HPLC-DAD). V rámci optimalizace složení mobilní fáze byl sledován vliv typu a obsahu organického modifikátoru (acetonitril a methanol), koncentrace octanu amonného (1 – 10 mmol·dm^{-3}) a jeho hodnoty pH (2,70 – 3,90) na separaci studovaných toxinů (α-amanitinu, β-amanitinu, falacidinu a faloidinu). Optimalizované podmínky byly následující: Jako vodná složka (A) mobilní fáze byl zvolen 1 mmol·dm^{-3} vodný roztok octanu amonného o pH 3,33 a jako organický modifikátor (B) byl zvolen methanol v poměru A:B = 55:45 (*v*/*v*). V tomto systému eluovaly studované analyty v následujícím pořadí: 1. β-amanitin (t_R = 4,32 minut), 2. α-amanitin (t_R = 4,90 minut), 3. falacidin (t_R = 8,51 minut) a 4. faloidin (t_R = 9,46 minut) a pro všechny analyty bylo dosaženo rozlišení až na základní linii.

Pro extrakci studovaných toxinů z klobouku muchomůrky zelené byla použita směs 0,1% vodného roztoku kyseliny mravenčí a methanolu v poměru 1:1 (*v*/*v*), extrakt byl odpařen a znovu rozpuštěn v deionizované vodě a aplikován na SPE-kolonku pro určení SPE výtěžnosti pro všechny analyty.

Optimalizace SPE extrakce na kolonce Supel-Select HLB na bázi polystyrenu probíhala nejprve s jednotlivými analyty a poté se směsným vodným roztokem všech analytů. Bylo zjištěno, že pro dobrou výtěžnost β-amanitinu a falacidinu je nutné roztok pro SPE extrakci mírně okyselit. Po této úpravě bylo pro směsný roztok standardů všech analytů o koncentraci 10 a 20 μg·ml^{-1} dosaženo výtěžnosti v rozmezí 77,6 – 92,8 % a pro směsný roztok standardů o koncentraci 40 μg·ml^{-1} výtěžnosti v rozmezí 66,6 – – 88,2 %. Pro extrakt z muchomůrky zelené se výtěžnost SPE extrakce (porovnání ploch píků jednotlivých toxinů před SPE extrakcí a po extrakci) pohybovala v rozmezí 79,0 – 94,1 % pro nezředěný extrakt a mezi 64,5 – 102,2 % pro čtyřikrát zředěný extrakt.

Získané výsledky budou sloužit jako podklad pro vývoj SPE extrakce a následné UHPLC metody spojené s hmotnostní detekcí pro analýzu studovaných toxinů v tělních tekutinách.

6 Literatura

[1] Vetter J.: Toxins of Amanita phalloides. *Toxicon* **36**, 13 – 24 (1998).

[2] Merová B., Staňková M., Stříbrný J., Ondra P.: LC-MS: Objektivní metoda diagnostiky intoxikací muchomůrkami. *Chemické Listy* **106**, 831 – 835 (2012).

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

[4] Tang S., Zhou Q., He Z., Luo T., Zhang P., Cai Q., Yang Z., Chen J., Chen Z.: Cyclopeptide toxins of lethal amanitas: Compositions, distribution and phylogenetic implication. *Toxicon* **120**, 78 – 88 (2016).

[5] Garcia J., Oliveira A., Pinho P. G., Freitas V., Carvalho A., Baptista P., Pereira E., Bastos M. de L., Carvalho F.: Determination of amatoxins and phallotoxins in Amanita phalloides mushrooms from northeastern Portugal by HPLC-DAD--MS. *Mycologia* **107**, 679 – 687 (2015).

[6] Garcia J., Costa V. M., Carvalho A., Baptista P., Pinho P. G., Bastos M. de L., Carvalho F.: Amanita phalloides poisoning: Mechanisms of toxicity and treatment. *Food and Chemical Toxicology* **86**, 41 – 55 (2015).

[7] Bonnet M. S., Basson P. W.: The toxicology of Amanita phalloides. *Homeopathy* **91**, 249 – 254 (2002).

[8] Kaya E., Yilmaz I., Sinirlioglu Z. A., Karahan S., Bayram R., Yaykasli K. O., Colakoglu S., Saritas A., Severoglu Z.: Amanitin and phallotoxin concentration in Amanita phalloides var. alba mushroom. *Toxicon* **76**, 225 – 233 (2013).

[9] Erhartovi J. a M.: *Houbařský atlas*. Plav u Českých Budějovic, Vlastním nákladem 2007.

[10] Papoušek T.: *Velký fotoatlas hub z jižních Čech*. České Budějovice, Tiskárna Josef Posekaný 2010.

[11] Dvořák R.: *Amanita phalloides – muchomůrka zelená*. Praha, Česká mykologická společnost 2011. Dostupné z URL: <www.myko.cz/clanek198/> [cit. 16.12.2016].

[12] Wieland T.: *Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms*. New York, Springer 1986.

[13] Kaya E., Karahan S., Bayram R., Yaykasli K. O., Colakoglu S., Saritas A.: Amatoxin and phallotoxin concentration in Amanita phalloides spores and tissues. *Toxicology and Industrial Health* **31**, 1172 – 1177 (2015).

[14] Nomura M., Suzuki Y., Kaneko R., Ogawa T., Hattori H., Seno H., Ishii A.: Simple and rapid analysis of amatoxins using UPLC-MS-MS. *Forensic Toxicology* **30**, 185 – 192 (2012).

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

[16] Chung W., Tso S., Sze S.: Separation of Polar Mushroom toxins by Mixed--Mode Hydrophilic and Ionic Interaction Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* **45**, 104 – – 111 (2007).

[17] Sgambelluri R. M., Epis S., Sassera D., Luo H., Angelos E. R., Walton J. D.: Profiling of Amatoxins and Phallotoxins in the Genus Lepiota by Liquid Chromatography Combined with UV Absorbance and Mass Spectrometry. *Toxins* **6**, 2336 – 2347 (2014).

[18] Robinson-Fuentes V. A., Jaime-Sánchez J. L., García-Aguilar L., Gómez-Peralta M., Vázquez-Garcidueñas M. S., Vázquez-Marrufo G.: Determination of α- and β-amanitin in clinical urine samples by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **47**, 913 – 917 (2008).

[19] Pacáková V., Štulík K.: *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. Praha, Státní pedagogické nakladatelství 1986.

[20] Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*. Praha, Karolinum 2004.

[21] Nováková L., Douša M. a kol.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*. Praha, Europrint a.s. 2013.

[22] Nováková L., Douša M. a kol.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.*. Praha, Europrint a.s. 2013.

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

[24] Zhou Z., Cao M., Zhou L., Zuo X., Tang Y.: Determination of α-Amanitin in Human Serum by Solid-Phase Extraction Coupled with HPLC-UV. *LCGC North America* **29**, 672 – 677 (2011).

[25] Tomková J., Ondra P., Válka I.: Simultaneous determination of mushroom toxins α-amanitin, β-amanitin and muscarine in human urine by solid-phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography coupled with ultra--high-resolution TOF mass spectrometry. *Forensic Science International* **251**, 209 – 213 (2015).

[26] Zhang S., Zhao Y., Li H., Zhou S., Chen D., Zhang Y., Yao Q., Sun C.: A Simple and High-Throughput Analysis of Amatoxins and Phallotoxins in Human Plasma, Serum and Urine Using UPLC-MS/MS Combined with PRiME HLB μElution Platform. *Toxins* **8**, 1 – 13 (2016).

[27] Sullivan G., Brady L. R., Tyler V. E.: Identification of α- and β-amanitin by Thin-Layer Chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **54**, 921 – 922 (1965).

[28] Enjalbert F., Bourrier M. J., Andary C.: Assay for the main phallotoxins in Amanita phalloides Fr. by direct fluorimetry on thin-layer plates. *Journal of Chromatography* **462**, 442 – 447 (1989).

[29] Stijve T., Seeger R.: Determination of α-, β-, and γ-Amanitin by High Performance Thin-Layer Chromatography in Amanita phalloides (Vaill. ex Fr.) Secr. from Various Origin. *Zeitschrift für Naturforschung* **34**, 1133 – 1138 (1979).

[30] Rittgen J., Pütz M., Pyell U.: Identification of toxic oligopeptides in Amanita fungi employing capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry with positive and negative ion detection. *Electrophoresis* **29**, 2094 – 2100 (2008).

[31] Gulikova D. K., Gainullina E. T., Ponsov M. A., Rybal'chenko I. V., Ryzhikov S. B., Fateenkov V. N.: A Rapid Test for Toxins from Amanita phalloides Mushrooms. *Journal of Analytical Chemistry* **68**, 1089 – 1092 (2013).

[32] Andres R. Y., Frei W., Gautschi K., Vonderschmitt D. J.: Radioimmunoassay for Amatoxins by Use of Rapid, ^{125}I-Tracer-Based System. *Clinical Chemistry* **32**, 1751 – 1755 (1986).

[33] Abuknesha R. A., Maragkou A.: A highly sensitive and specific enzyme immunoassay for detection of β-amanitin in biological fluids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **379**, 853 – 860 (2004).

[34] Gausterer C., Penker M., Krisai-Greilhuber I., Stein C., Stimpfl T.: Rapid genetic detection of ingested Amanita phalloides. *Forensic Science International: Genetics* **9**, 66 – 71 (2014).

[35] Xu X.., Cai Z., Zhang J., Chen Q., Huang B., Ren Y.: Screening of polypeptide toxins as adulteration markers in the food containing wild edible mushroom by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Food Control* **71**, 393 – 402 (2017).

[36] Musil K.: *Vývoj HPLC-DAD-MS/MS metody pro stanovení vybraných toxinů v muchomůrce zelené* (diplomová práce). Praha, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy 2015.