

LC-MS: OBJEKTIVNÍ METODA DIAGNOSTIKY INTOXIKACÍ MUCHOMŮRKAMI

BARBORA MEROVÁ^a, MARIE STAŇKOVÁ^{a,b},
JAN STRÍBRNÝ^c a PETER ONDRA^a

^a Ústav soudního lékařství a med. práva, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 09 Olomouc,

^b Ústav soudního lékařství, Fakultní nemocnice Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba, ^c Vojenský ústav soudního lékařství, Ústřední vojenská nemocnice Praha, U vojenské nemocnice 1200, 169 02 Praha 6
barbora.merova@upol.cz

Došlo 26.8.11, přepracováno 18.10.11, přijato 8.12.11.

Klíčová slova: muchomůrky, LC-MS, muskarin, amatoxiny, falotoxiny, intoxikace

Úvod

Každý rok dochází v České republice k řadě houbových intoxikací. Mezi nejzávažnější otravy patří intoxikace houbami z rodu *Amanita* (muchomůrky). Z hlediska toxicity jsou nejvýznamnějšími houbami muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*), muchomůrka červená (*Amanita muscaria*) a muchomůrka tygrovaná (*Amanita pantherina*). Muchomůrky červená a tygrovaná jsou zneužívány pro svoje psychotropní účinky především mladými lidmi. Muchomůrka tygrovaná je rovněž zaměňována při sběru hub pro svou podobu s jedlou houbou – muchomůrkou růžovou. Muchomůrka zelená je zase nejčastěji zaměňována s některými druhy holubinek (holubinka nazelenalá, holubinka trávovězelená) a pečárek (známých jako žampiony)¹.

Mezi hlavní toxiny muchomůrky červené a muchomůrky tygrované patří kyselina ibotenová, muscimol a muskarin. Naše předchozí studie² prokázala velice problematickou extrahovatelnost kyseliny ibotenové a muscimolu z moče a séra. Z tohoto důvodu jsme se v části této práce zaměřili na LC-MS metodu pro průkaz, popř. stanovení muskarinu z biologického materiálu pacientů intoxikovaných muchomůrkou červenou a tygrovanou. Muskarin, který byl jako první houbový toxin izolován v roce 1869 z muchomůrky červené, byl dlouhá léta považován za hlavní aktivní látku této houby. Muskarin působí na tu část periferního nervového systému, který využívá acetylcholinu jako mediátoru na postgangliovém zakončení parasymptatických vláken. Symptomy otravy muskarinem zahrnují miózu, nejasné vidění, zvýšenou perspiraci, salivaci a lakrimaci, zpomalení srdeční činnosti^{3–6}.

Muchomůrka zelená obsahuje tři skupiny toxinů. Jsou to amatoxiny, falotoxiny a falolysiny. Z hlediska otravy jsou nejdůležitější amatoxiny, bicyklické oktapolypeptidy, z nichž nejjedovatější jsou α -amanitin a β -amanitin. Amanitiny se v jádru eukaryotních organismů vážou v komplex s RNA polymerasou II, a to již při velmi nízkých koncentracích (10^{-9} mol l⁻¹). Inhibice enzymu vede k přerušení (zástavě) proteosyntézy a k nekróze buňky. Nejvíce postiženými orgány jsou játra a ledviny^{3,7}. Falotoxiny se nevstřebávají z gastrointestinálního traktu, a proto při perorální otravě člověka nemají významnou roli. Nicméně při subkutánním či intravenózním podání mají podobné účinky na buňky jako amanitiny, což bylo prokázáno na potkanech^{8,9}. V literatuře můžeme nalézt pouze malé množství článků zabývajících se izolací toxinů muchomůrky zelené z moče a séra intoxikovaných osob^{10–19}. Tyto postupy nejsou vhodné pro rychlý screening v rámci diagnostiky těchto otrav.

V současné době se v České republice při vyšetřování houbových otrav využívá subjektivní mikroskopické metody, která v sobě ovšem zahrnuje řadu úskalí – od nevhodného odběru vzorku (např. špatný odběr žaludečního obsahu, kdy je k vyšetření dodán čirý výplach po lavážích žaludku, již bez přítomnosti spor) až po nedostatečnou erudovanost odborníka, který vyšetření provádí. S rozvojem moderních chromatografických metod je snahou zavést do rutinní toxikologické praxe vhodné analytické postupy k objektivní diagnostice houbových intoxikací. Za tímto účelem byla vypracována a do praxe zavedena nová metoda LC-MS použitelná k analýze již zmiňovaného muskarinu, α -amanitinu, β -amanitinu a faloidinu.

Experimentální část

Chemikálie a materiál

Muskarin, α -amanitin, β -amanitin, faloidin a falocidin, methanol gradient grade pro HPLC, acetonitril gradient grade pro HPLC, kyselina mravenčí pro LC-MS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), heptafluoromáselná kyselina p.a., kyselina mravenčí pro LC-MS (Fluka, St. Louis, USA), octan amonný (Merck, Darmstadt, Německo), kyselina chlorovodíková konc. (Penta, Chrudim, ČR), voda gradient grade pro HPLC byla vyrobena purifikačním systémem Aqual (Brno, ČR). SPE kolonky Strata X-CW a analytické kolony Gemini C18 (150 × 2,0 mm i.d., 5 μ m) a Synergi Polar RP (100 × 2,0 mm i.d., 2,5 μ m) byly zakoupeny od firmy Phenomenex (Torrance, USA).

Vzorky negativní moče a séra a vzorky moče, žaludečního a střevního obsahu od pacientů intoxikovaných muchomůrkami byly získány na Ústavech soudního lékařství fakultních nemocnic v Olomouci a Ostravě.

Instrumentace LC-MS

Měření byla provedena na přístroji LC-MS firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko). Systém se skládá ze dvou pump LC-10AC, degaseru DGU-14A, autosampleru SIL-HT, kolonového termostatu CTO-10AC a hmotnostního spektrometru LC-MS2010A (kvadrupól s ionizací za atmosférického tlaku – ESI a APCI). Jako iontový zdroj byl použit elektropray.

Analýzy muskarinu byly provedeny na koloně Gemini C18 (150 × 2,0 mm i.d., 5 μm), která byla termostatována na 30 °C. Mobilní fázi A tvořila 8 mmol l⁻¹ heptafluoromáselná kyselina a mobilní fázi B byl acetonitril. Měření probíhalo v gradientovém módu: 0–15 min: 0 % – 37 % B, 15–16 min: 37 % – 0 % B. Následně byla kolona 15 min ekvilibrována mobilní fází A. Průtoková rychlost byla 0,2 ml min⁻¹.

Toxiny muchomůrky zelené byly analyzovány na koloně Synergi RP Polar (100 × 2,0 mm, 2,5 μm), která byla termostatována na 35 °C. Mobilní fázi A tvořil 0,1 mol l⁻¹ octan amonný s přidavkem 0,1 % kyseliny mravenčí, mobilní fázi B byl acetonitril. Měření probíhalo v gradientovém módu: 0–10 min: 5 % – 40 % B, 10–12 min: 40 % – 5 % B. Následně byla kolona 8 min ekvilibrována mobilní fází A. Průtoková rychlost byla 0,2 ml min⁻¹.

Měření byla prováděna jednak v „single ion“ módu, kdy studované látky byly identifikovány na základě svých retenčních časů, jednak ve scan módu, kdy studované látky byly identifikovány na základě svých hmotnostních spekter. Jednotlivé *m/z* byly 174 [M⁺] pro muskarin, 216 [M⁺] pro acetylovaný muskarin (interní standard), 919 [M⁺] pro α-amanitin, 920 [M⁺] pro β-amanitin, 789 [M⁺] pro faloidin a 847 [M⁺] pro falacidin.

Extrakce

Pro extrakci muskarinu, α-amanitinu, β-amanitinu, faloidinu a falacidinu z biologického materiálu byl použit shodný postup. Kolonka Strata X-CW byla nejdříve promyta 1 ml methanolu, poté 1 ml 0,1 mol l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové. Na kolonku byl aplikován 1 ml vzorku. Kolonka byla promyta 1 ml acétátového pufru pH 4,5, následovalo sušení za vakua 1 min. Eluce byla provedena 1 ml 5% kyseliny mravenčí v methanolu. Eluát byl v proudu dusíku odpařen do sucha. Pro analýzu muskarinu byl odparek následně rozpuštěn v 0,1 ml vody, zatímco pro analýzu toxinů muchomůrky zelené byl odparek rozpuštěn v 0,1 ml směsi methanol : voda (1:1). Nástřík do LC-MS systému byl 5 μl vzorku.

Validace metody LC-MS

Pro stanovení muskarinu v moči byl jako interní standard použit acetylovaný muskarin. Pro stanovení α-amanitinu a β-amanitinu v moči a séru byl použit jako interní standard falacidin. K ověření linearitity byla sestrojena šestibodová kalibrační křivka. Limit detekce (LOD)

a limit kvantifikace (LOQ) byly stanoveny pomocí poměru signálu a šumu 3:1, resp. 10:1. Výtěžnost SPE byla vypočítána jako poměr plochy píku spikovaného vzorku, který byl zpracován SPE postupem ku ploše píku vzorku spikovaného až po extrakci. Preciznost a přesnost byla spočítána ze tří různých koncentrací, měřených v pěti opakováních ve třech po sobě jdoucích dnech.

Výsledky a diskuse

Extrakce

Cílem bylo dosáhnout jednotného extrakčního kroku pro všechny zmíněné látky, tzn. muskarin, α-amanitin, β-amanitin, faloidin a použité interní standardy acetylovaný muskarin a falacidin. V předchozí studii² bylo zjištěno, že pro izolaci muskarinu z moče je nejvhodnější extrakce na pevné fázi za použití kolonky Strata X-CW. Experimentálně bylo zjištěno, že zmíněný extrakční postup je rovněž vhodný i pro izolaci toxinů muchomůrky zelené z biologického materiálu, jako je moč, sérum, žaludeční obsah, popř. střevní obsah.

Optimalizace parametrů MS

Pro nalezení vhodných parametrů iontového zdroje a iontové optiky byly použity vodné roztoky standardů muskarinu o koncentraci 0,2 μg ml⁻¹, α-amanitinu, β-amanitinu, faloidinu a falacidinu, vše o koncentraci 2,0 μg ml⁻¹. Roztoky byly přímo injektovány do hmotnostního spektrometru. Byla testována závislost odezev jednotlivých standardů na daných parametrech. Experimenty byly provedeny v tripletech. Pro muskarin byly optimalizované parametry iontového zdroje a iontové optiky následující: napětí na kapiláře 2 kV, teplota vyhřívání kapiláry 240 °C, napětí na vyhřívání kapiláře –10 V, rychlost proudění sušícího plynu (dusík) 1,5 l min⁻¹. Pro toxiny muchomůrky zelené byly optimalizované parametry iontového zdroje a iontové optiky následující: napětí na kapiláře 4,5 kV, teplota vyhřívání kapiláry 250 °C, napětí na vyhřívání kapiláře –20 V, rychlost proudění sušícího plynu (dusík) 1,5 l min⁻¹.

Optimalizace separačních podmínek

V předchozí studii²⁰ bylo zjištěno, že nejlepších separačních podmínek je dosaženo za použití mobilní fáze složené z 8 mmol l⁻¹ vodného roztoku heptafluoromáselné kyseliny a acetonitrilu a kolony Gemini C18.

K separaci α-amanitinu, β-amanitinu, faloidinu a falacidinu byla použita kolona Synergi RP Polar, vhodná pro analýzu polárních sloučenin. Při optimalizaci separačních podmínek byl sledován a) průtok mobilní fáze a b) složení mobilní fáze acetonitril : vodný roztok octanu amonného s přidavkem 1 % kyseliny mravenčí. Nejlepších výsledků, kdy došlo k rozdělení všech čtyř studovaných analytů, bylo dosaženo použitím gradientového módu: 0 až

10 min: 5 % – 40 % acetonitrilu, 10–12 min: 40 % – 5 % acetonitrilu s konstantním průtokem 0,2 ml min⁻¹.

Validace LC-MS metody

Získané parametry validace pro stanovení muskarinu: kalibrační křivka byla lineární v rozmezí 0,0003 až 2,0 µg ml⁻¹. Koeficient determinace byl 0,9993, což indikuje dostatečnou linearitu metody pro její aplikaci v klinické diagnostice. Limit detekce byl 0,09 ng ml⁻¹ a limit kvantifikace 0,3 ng ml⁻¹. Výtěžnost extrakce muskarinu byla 95 %. Preciznost a přesnost metody měřena v rámci jednoho dne a v průběhu třech po sobě následujících dní je znázorněna v tab. I.

Získané parametry validace pro stanovení α-amanitinu a β-amanitinu z moče: kalibrační křivka pro obě

látky byla lineární v rozmezí 0,002 až 10,0 µg ml⁻¹. Koeficient determinace byl 0,998 pro α-amanitin a 0,995 pro β-amanitin, což indikuje dostatečnou linearitu metody pro její aplikaci v klinické diagnostice. Limit detekce byl 0,6 ng ml⁻¹ a limit kvantifikace 2,0 ng ml⁻¹ pro oba analyty. Výtěžnost extrakce pro α-amanitin byla 97 % a pro β-amanitin 96 %. Preciznost a přesnost metody pro α-amanitin a β-amanitin měřena v séru a moči v rámci jednoho dne a v průběhu třech po sobě následujících dní je znázorněna v tab. I.

Získané parametry validace pro stanovení α-amanitinu a β-amanitinu ze séra: kalibrační křivka pro obě látky byla lineární v rozmezí 0,003 až 10,0 µg ml⁻¹. Koeficient determinace byl 0,993 pro α-amanitin a 0,997 pro β-amanitin, což indikuje dostatečnou linearitu metody pro

Tabulka I

Preciznost a přesnost metody pro sledované látky měřena v moči a séru v rámci jednoho dne a v průběhu třech po sobě následujících dní

Přidaná koncentrace [µg ml ⁻¹]	Opakovatelnost			Mezilehlá preciznost		
	průměrná vypočtená koncentrace [µg ml ⁻¹]	preciznost [RSD, %]	přesnost [rel. chyba, %]	průměrná vypočtená koncentrace [µg ml ⁻¹]	preciznost [RSD, %]	přesnost [rel. chyba, %]
<i>muskarin v moči</i>						
0,0003	0,00029 ± 3,11·10 ⁻⁶	0,48	-3,3	0,00029 ± 1,12·10 ⁻⁵	4,02	-3,33
0,2	0,19 ± 0,012	0,66	-5,0	0,194 ± 0,011	5,49	-3,0
2,0	1,91 ± 0,009	1,39	-4,5	1,88 ± 0,045	2,39	-6,0
<i>α-amanitin v moči</i>						
0,002	0,00188 ± 0,00014	7,87	-6,0	0,00187 ± 0,00017	9,4	-6,5
2,0	1,83 ± 0,06	3,6	-8,4	1,82 ± 0,06	3,35	-8,95
10,0	9,93 ± 0,19	1,96	-0,68	9,83 ± 0,11	1,2	-1,72
<i>α-amanitin v séru</i>						
0,003	0,00275 ± 0,00007	2,58	-8,3	0,0027 ± 0,00005	2,13	-10,0
2,0	1,99 ± 0,06	3,02	-0,5	1,98 ± 0,014	0,7	-1,0
10,0	9,99 ± 0,31	3,15	-0,1	9,96 ± 0,04	0,48	-0,4
<i>β-amanitin v moči</i>						
0,002	0,00184 ± 0,00015	8,26	-8	0,00194 ± 0,00019	9,8	-3,0
2,0	1,91 ± 0,08	4,33	-4,7	1,82 ± 0,05	2,87	-8,9
10,0	9,69 ± 0,04	0,42	-3,12	9,73 ± 0,04	0,47	-2,7
<i>β-amanitin v séru</i>						
0,003	0,0027 ± 0,00014	5,18	-10,0	0,0026 ± 0,00015	5,76	-13,3
2,0	2,18 ± 0,018	0,82	9,0	2,14 ± 0,036	1,68	3,5
10,0	9,77 ± 0,12	1,28	-2,3	9,86 ± 0,12	1,3	-1,35

její aplikaci v klinické diagnostice. Limit detekce byl $0,9 \text{ ng ml}^{-1}$ a limit kvantifikace $3,0 \text{ ng ml}^{-1}$ pro oba analyty. Výťažnost extrakce pro α -amanitin byla 93 % a pro β -amanitin 94 %. Preciznost a přesnost metody pro α -amanitin a β -amanitin měřená v séru a moči v rámci jednoho dne a v průběhu třech po sobě následujících dní je znázorněna v tabulce I.

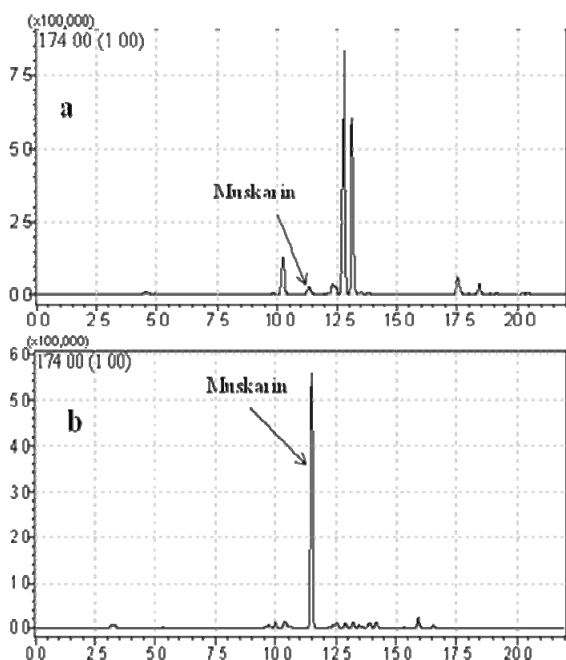
Analýza reálných vzorků pacientů

Případ č. 1

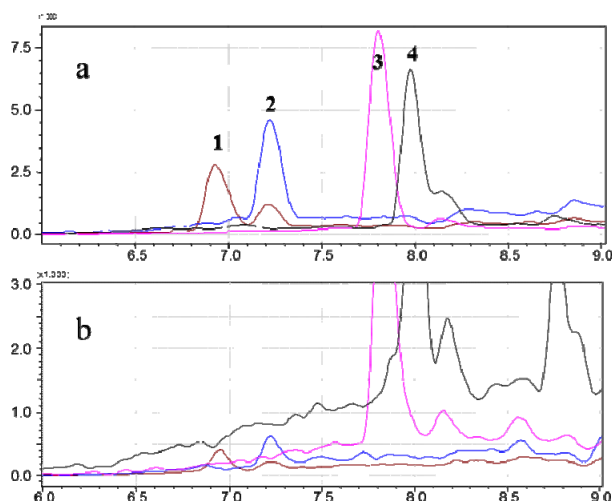
26letý muž, který si přes internet objednal tzv. „magic mushrooms“ snědl na párty 6 kusů těchto hub. Později si šel lehnout. Po další hodině byl přáteli nalezen v bezvědomí. Při příjezdu rychlé záchrané služby měl muž již zástavu srdce. Přes veškeré snahy lékařů pacient umírá. Moč a žaludeční obsah pacienta byly odebrány při pitvě. V moči a žaludečním obsahu pacienta byl prokázán muskarin (obr. 1).

Případ č. 2

V tomto případě šlo o 7leté dítě, které dva dny po sobě jedlo houbový pokrm. Následující den, vzhledem k zažívacím potížím, rodiče s dítětem navštívili dětského lékaře, kde se ovšem nezmiňovali o požití hub a tak dítě bylo odesláno domů. Po dalším zhoršení stavu, bylo dítě čtvrtý den od požití hub hospitalizováno v nemocnici, kde již rodiče uvedli požití hub. Vzhledem k vysoké hodnotě jaterních testů vzniklo podezření na požití muchomůrky zelené. Přes zahájení léčby dítě umírá 7. den od požití hub.



Obr. 1. Chromatografický záznam moče (a) a žaludečního obsahu (b) pacienta po SPE s nálezem muskarinu



Obr. 2. Chromatografický záznam střevního obsahu (a) a obsahu apendixu (b) pacientky po SPE s nálezem β -amanitinu, α -amanitinu, falacidinu a faloidinu; 1 – β -amanitin, 2 – α -amanitin, 3 – falacidin a 4 – faloidin

Moč byla odebrána pátý den od požití hub. Při pitvě byl odebrán obsah apendixu a střevní obsah. Jak lze vidět na obr. 2, ve střevním obsahu a apendixu byla potvrzena přítomnost α -amanitinu, β -amanitinu, faloidinu a falacidinu. Vzhledem k provedené dialýze nebyla již prokázána přítomnost α -amanitinu, β -amanitinu ani faloidinu v moči dítěte.

Závěr

Validovaná metoda LC-MS byla vypracována pro průkaz a stanovení a) muskarinu z moče intoxikovaných osob a b) α -amanitinu a β -amanitinu z moče a séra intoxikovaných pacientů. Součástí metody bylo rovněž vypracování jednotného izolačního postupu pro zmíněné toxiny z biologického materiálu. Vypracovaná LC-MS metoda byla použita pro průkaz muskarinu, α -amanitinu, β -amanitinu a faloidinu v reálných vzorcích intoxikovaných pacientů. Metoda je rovněž vhodná k průkazu toxinů v žaludečním a střevním obsahu intoxikovaných osob. Vypracovaná objektivní LC-MS metoda je dostatečně citlivá pro diagnostiku otrav houbami obsahujícími diskutované toxiny a může nahradit subjektivní a poměrně pracné mikroskopické vyšetření zaměřené na nález spor v žaludečním obsahu a stolici.

Autoři děkují za finanční podporu grantové agentuře Ministerstva zdravotnictví České republiky (IGA NS10269-3). Velké díky rovněž patří Michaelu D. Schwartzovi, MD z Office of Terrorism Preparedness & Emergency Respon-

se, National Center for Environmental Health, Centers for Disease Control, Atlanta a Ziadu Kazzimu, MD, FAAEM, FACEP, Assistant Professor of Emergency Medicine, The Georgia Poison Center za poskytnutí biologického materiálu v případě č. 1.

LITERATURA

1. Laux H. E.: *Jedlé houby a jejich jedovatí dvojníci*. Víkend, Český Těšín 2006.
2. Merová B., Ondra P., Staňková M., Válka I.: *Neuro. Endocrinol. Lett.* 29, 744 (2008).
3. Schonwald S., v knize: *Medical toxicology* (Dart R. C., ed.), kap. 257. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2004.
4. Jahodář L., v knize: *Přírodní toxiny a jedy* (Houdek L., ed.), kap. 5,3. Galén, Praha 2004.
5. Michelot D., Melendez-Howell L. M.: *Mycol. Res.* 107, 131 (2003).
6. Satora L., Pach D., Butryn B., Hydzik P., Balicka-Slusarczyk B.: *Toxicon* 45, 941 (2005).
7. Herink J., Rychlík I., Pelclová D.: *Toxické poškození ledvin houbami*. Maxdorf, Praha 2004.
8. Wieland T.: *Int. J. Pept. Protein Res.* 22, 257 (1983).
9. Faulstich H., Münter K.: *Klin. Wochenschr.* 64, 66 (1986).
10. Pastorello L., Tolentino D.: *J. Chromatogr.* 233, 398 (1982).
11. Belliardo F., Massano G.: *J. Liq. Chromatogr.* 6, 551 (1983).
12. Caccialanza G., Gandini C., Ponci R.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 3, 179 (1985).
13. Jehl F., Gallion C., Birckel P., Jaeger A., Flesch F., Minck R.: *Anal. Biochem.* 149, 35 (1985).
14. Homann J., Rawer P., Henning B., Matthes K. J., Heinrich D.: *Arch. Toxicol.* 59, 190 (1986).
15. Brüggemann O., Meder M., Freitag R.: *J. Chromatogr., A* 744, 167 (1996).
16. Defendenti C., Bonacina E., Mauroni M., Gelosa L.: *Forensic Sci. Int.* 92, 59 (1998).
17. Maurer H. H., Schmitt C. J., Weber A. A., Kraemer T.: *J. Chromatogr., B* 748, 125 (2000).
18. Butera R., Locatelli C., Coccini T., Manzo L.: *Clin. Toxicol.* 42, 901 (2004).
19. Filigenzi M. S., Poppenga R. H., Tiwary A. K., Puschner B.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 2784 (2007).
20. Merová B., Ondra P., Staňková M., Sural M., Stříbrný J., Hebká L., Lemr K.: *J. Chromatogr., B*, v tisku.

B. Merová^a, M. Staňková^{a,b}, J. Stříbrný^c, and P. Ondra^a (^a Institute of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Palacky University, Olomouc, ^b Institute of Forensic Medicine, University Hospital Ostrava, ^c Institute of Forensic Medicine, Central Military Hospital, Prague): **LC-MS - an Objective Diagnostic Method of Amanita Intoxications**

A LC-MS method for determination of muscarine and amatoxins in urine and blood serum was developed and validated. The analysis was carried out using an LC/MS quadrupole device equipped with electrospray. The separation of muscarine, α -amanitin, β -amanitin, phalloidin and phalloidin was performed on analytical columns in the gradient mode. The applicability of the method has been demonstrated by analyzing clinical samples.