



SCREENING METHOD FOR THE ANALYSIS OF BLOOD AND URINE FOR THE PRESENCE OF NATURALLY OCCURRING TOXIC COMPOUNDS FROM MUSHROOMS (FUNGI) USING THE LC-MS METHOD

Bartłomiej FEIGEL, Dariusz ZUBA, Wojciech LECHOWICZ

Institute of Forensic Research, Kraków, Poland

Abstract

Analysis of biological material collected during autopsies and even from living humans for the presence of amanitins and other fungal toxins remains a challenge in forensic toxicology. A qualitative method for the detection of α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, muscarine, and psilocin in blood and urine has been developed. To achieve this goal, solid phase extraction HLB 3cc 60mg columns were used. Blood and urine samples were purified with water and aqueous methanol solution, and then extracted with acetonitrile. An LC/QTOF system equipped with a C18 column was applied to identify the analytes. Acetonitrile and water with formic acid were utilized as mobile phases. The developed method was validated. The detection limits for α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, muscarine and psilocin are, respectively, 1.4 ng/ml, 0.3 ng/ml, 1.2 ng/ml, 1.8 ng/ml, and 0.3 ng/ml in blood, and 1.5 ng/ml, 2.1 ng/ml, 1.5 ng/ml, 1.6 ng/ml, and 1.1 ng/ml in urine. The developed method allows for efficient, qualitative identification of all the above-mentioned compounds in a toxicological laboratory.

Keywords

Amanitins; α -amanitin; β -amanitin; γ -amanitin; Muscarine; Psilocin; LC/Q-TOF; LC-MS.

Received 7 June 2021; accepted 2 November 2021

1. Introduction

Over the last few decades, the variety of mushrooms (fungi) that you can buy in shops or eat in restaurants has increased dramatically. More frequent consumption of mushrooms does not only concern cultivated varieties, but also those which can be obtained from the natural environment. In China, Japan and Europe there is a deeply rooted tradition of independently picking and eating mushrooms. This is supported by numerous illustrated publications containing photographs and information on the subject of mushroom toxicity (Hall, Stephenson, Buchanan, Wang, Cole, 2003; Lampe, 2018; Walton, 2018).

Mushroom poisoning is mainly caused by ingestion of toxins contained in them. In Poland, despite universal access to information concerning poisonous mushroom species and the deeply rooted tradition of mushroom picking, the number of poisonings is still high (Fig. 1). They cause various symptoms, the most frequent being intestinal disturbances, causing diarrhoea, nausea, gut ache and vomiting. We can divide them into early, late and very late poisonings. They sometimes differ in terms of time of onset of symptoms after the moment of consumption of poisonous mushroom species. Symptoms of early poisonings appear after about 6 h, late poisonings after 6–24 h, very late poisonings after more than 24 h.

The most common cause of poisoning is accidental consumption of poisonous mushrooms, which may be due to lack of knowledge or a simple mistake. The death cap (*Amanita phalloides*) can be mistaken for the green-cracking russula (*Russula virescens*), parasol mushroom or the common/field mushroom. The deadly fibrecap (*Inocybe erubescens*) resembles St George's mushroom or some species of *Agaricus*. The brain mushroom (*Gyromitra esculenta*) may be mistaken for the common morel (*Morchella esculenta*) (Marciniak, Ferenc, Kusowska, Ciećwierz, Kowalczyk, 2010; Gonmori, Fujita, Yokoyama, Watanabe, Suzuki, 2011; Pach, 2009). Almost all poisonous mushrooms except a few poisonous species *boletaceae* have lamellae (gills) under their caps, which makes it easier to distinguish them (Marciniak et al., 2010). Among the most dangerous mushrooms are species from the genus *Entoloma*, *Cortinarius*, *Amanita*, *Gyromitra*, *Inocybe*, *Galerina*, *Tricholoma*, *Clitocybe*, *Paxillus*, and *Macrolepiota* (Burda, 1998; Ciszowski, 2020). The substances contained in them have very broad toxic effects. Their consumption may result in liver or kidney damage, irreversible damage to the central nervous system, and in milder cases, gastrointestinal disorders (Burda, 1998).

Because of their widespread availability, mushrooms can be used to cause intentional harm to health

or murder. The deliberate consumption of species containing psychoactive compounds should not be overlooked either. These types of mushrooms are also present in Poland, are relatively easily available, and their consumption has strong psychedelic effects – they can lead to perception disorders, mood changes, or hallucinations.

Amatoxins are the most strongly acting toxins originating from mushrooms (Table 1). They exhibit hepatotoxicity, causing fulminant liver failure, leading to death (Burda, 1998; Ciszowski, 2020). They include α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, ϵ -amanitin, proamanulin, amanulin, amanulic acid, amanine, amaninamide; the most relevant to the present work are included in Fig. 2. Among the listed amanitins, α -amanitin shows the strongest toxicity. Its high decomposition temperature of over 254°C means that no form of culinary processing inactivates it. It is absorbed into the human body from the gastrointestinal tract, is detectable in blood 30 minutes after consumption, and excreted in urine over the next 72 hours. Its concentration in the blood declines rapidly over the next 36 hours, after which the chance of detecting this toxin in the blood decreases rapidly. Amongst the amanitins circulating in the blood, up to 57% of them can be captured by the liver (Faulstich, Talas, Wellhöner, 1985; Filigenzi, Poppenga, Tiwary, 2007; Magdalan, 2010).

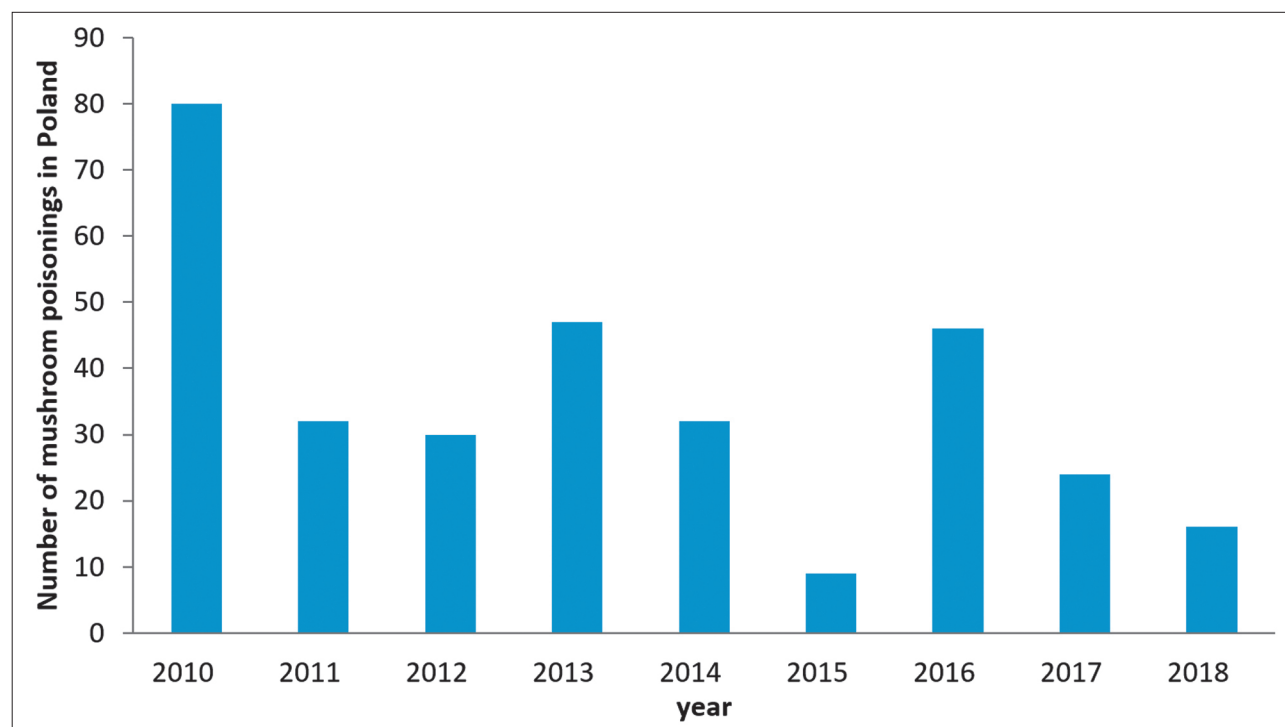


Fig. 1. Total number of mushroom poisonings in Poland between 2010–2018 (Chief Sanitary Inspector, 2010–2018).

Then, thanks to a polypeptide transporting organic anions, they enter liver cells where they bind to RNA polymerase II. This process results in inhibition of transcription and subsequently (inhibition of) protein synthesis, leading to liver cell death (Filigenzi et al., 2007; Oslon, 2011; Walton, 2018).

The most common cause of muscarine poisonings is accidental ingestion of mushrooms containing muscarine, which include mushroom species in the

inocybaceae family. Symptoms of poisoning caused by this toxin appear between 30–120 minutes after consumption (Bresinsky, 1990). When it enters the human body, muscarine (Fig. 3) binds to acetylcholine receptors, causing a set of characteristic symptoms such as salivation, pupil constriction, sweating, and bradycardia (Malone, Brown, Stuntz, Tayler, 1962; Burda, 1998; Catalfomo, Eugster, 1970).

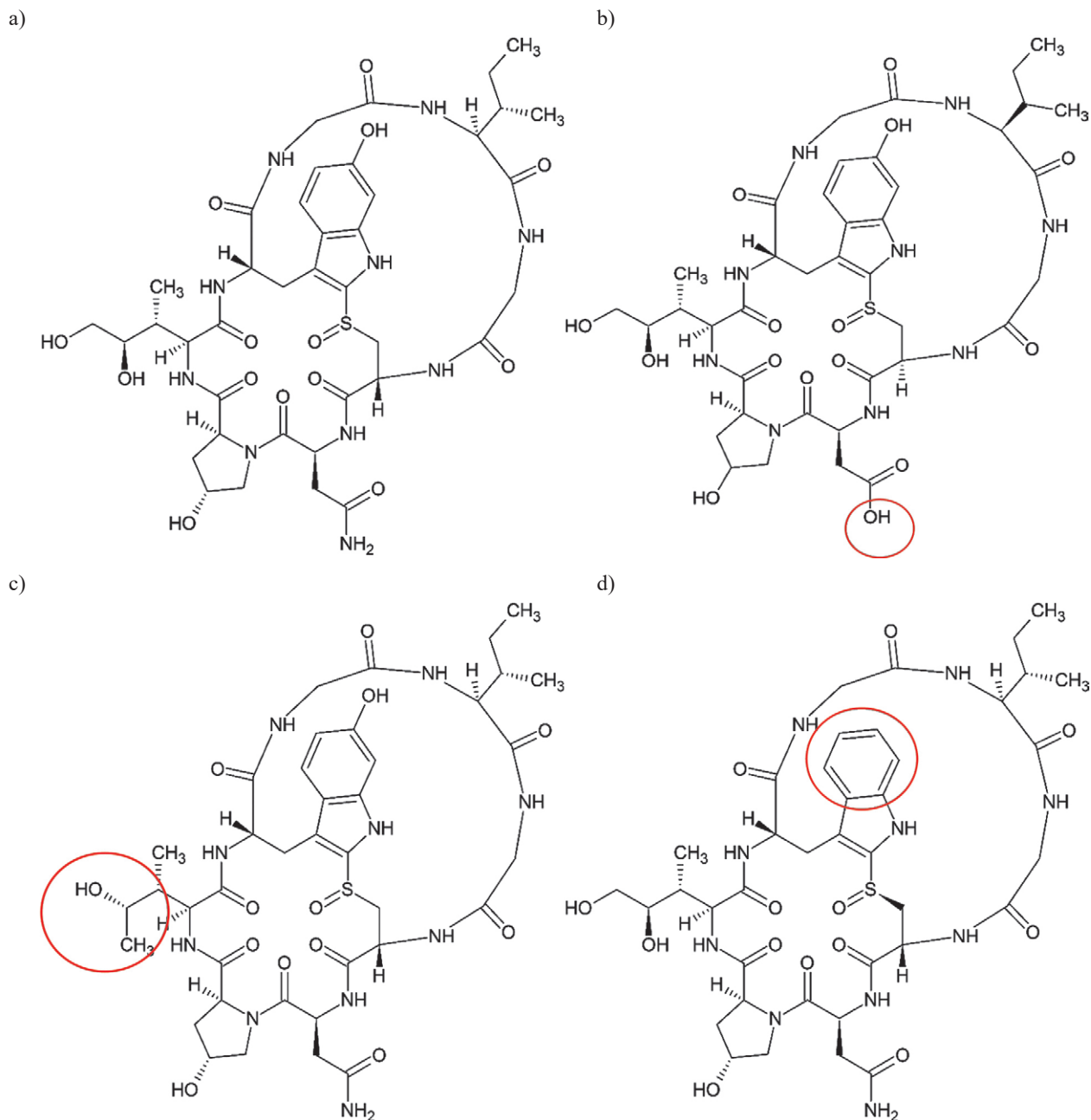


Fig. 2. Structural formulas of a) α -amanitin, b) β -amanitin, c) γ -amanitin, d) amaninamide. Differences between α -amanitin and other compounds are indicated in red circles.

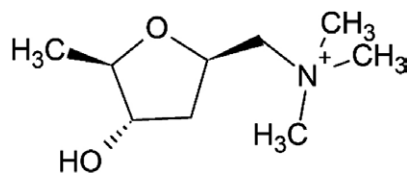


Fig. 3. Structural formula of muscarine.

Psilocin and psilocybin are psychoactive substances that occur naturally in mushrooms from the species *Psilocybe semilanceata*, *Psilocybe mexicana*, *Psilocibe cubensis*, *Psilocibe azurescens* (Dydak, Śliwińska-Mossoń, Milnerowicz, 2015; Geschwinde, 2003; Horita, Weber, 1961; Jasicka-Misiak, Młynarz, Kafarski, 2006; Martin, Schürenkamp, Pfeiffer, Köhler, 2011). The first symptoms appear between 10 and 30 minutes after consumption. These include dizziness, impaired coordination and pupil dilatation. The most characteristic symptoms occurring approximately 30 minutes after consumption include impaired perception, disturbed sense of time flow, and distorted perception of one's own body. The effects last for 4 to 8 hours (Pach, 2009). Both psilocin and psilocybin

have a chemical structure similar to serotonin (Fig. 4), and their affinity for serotonin receptors is responsible for their psychoactive effects (Bojko, 2014).

Ingested psilocybin is dephosphorylated to psilocin (Fig. 5), a pharmacologically active substance (Horita, Weber, 1961).

Table 1 contains information on lethal doses of the analysed substances; for psilocin, ibotenic acid and muscimol there are no relevant data in the literature.

Table 1
Lethal levels and doses of the analyzed substances in blood and urine

Compounds	Lethal levels in blood [ng/ml].	Lethal levels in urine [ng/ml].	Lethal dose [mg/kg]
α -amanitin	8.0–190	53–4820	0.1–0.3
β -amanitin	15.9–162	75–4400	0.1–0.3
γ -amanitin	–	–	0.1–0.3
muscarine	–	–	40–495

– no data

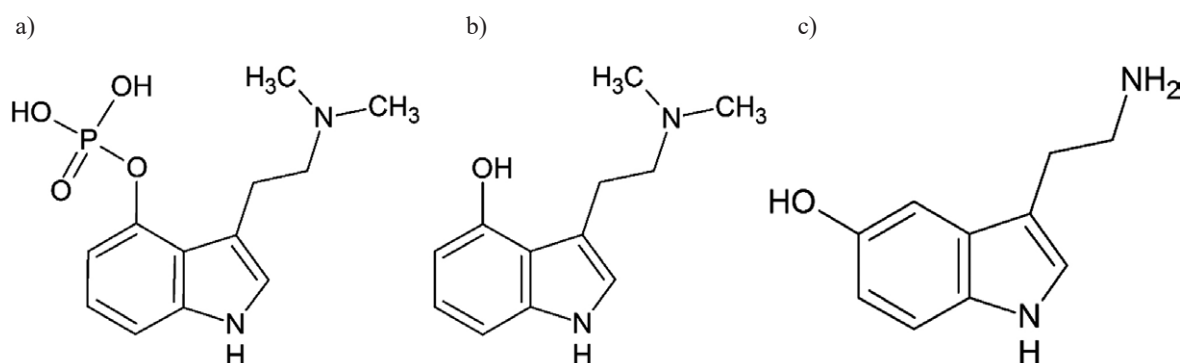


Fig. 4. Structural formulas of: a) psilocybin, b) psilocin and c) serotonin.

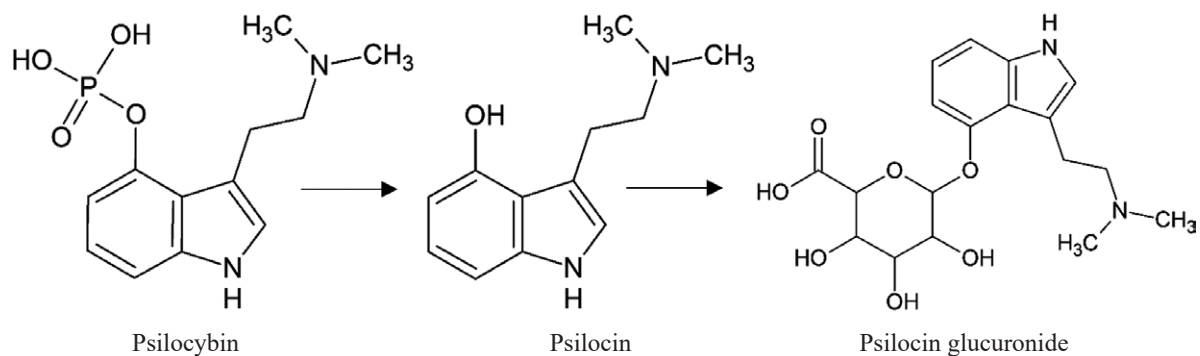


Fig. 5. Metabolic pathway of psilocybin.

Many methods have been developed for the detection of amanitins in blood and urine. Older publications focus on the detection of α -amanitin and β -amanitin using high-performance liquid chromatography (HPLC). The described methods use large amounts of reagents and analysed biological material; their detection limit is about 10 ng/ml (Belliaro, Massano, 1983; Jehl et al., 1985; Jaeger, Jehl, Flesch, Sauder, Kopferschmitt, 1993). A paper published in 2000 by Maurer et al. describes the detection of α -amanitin and β -amanitin in urine using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). This method has a satisfactory detection limit of 5 ng/ml for both analysed compounds. However, the extraction procedure is complicated, requires the use of immunoaffinity columns, incubation, and also consumes large amounts of analysed biological material (Maurer, Schmitt, Weber, Kraemer, 2000). Subsequent publications, published between 2010 and 2018, mention that much better detection limits of 0.22–10 ng/ml for α -amanitin and 0.20–10 ng/ml for β -amanitin in blood and urine have been achieved (Abbott et al., 2018; Tanahashi et al., 2010; Azul, 2013; Feng et al., 2015). γ -amanitin was only included in the method described in 2018, where the detection limit was set at 0.169 ng/ml in urine (Abbott et al., 2018). Various coupled techniques (LC-MS, capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry – CE-ESI-MS/MS) have been used to detect muscarine, and their detection limit ranges from 0.09 to 0.73 ng/ml. The analysed biological material was urine (Ginterová et al., 2014; Merová et al., 2011). Various chromatographic techniques (HPLC, LC-MS, LC-MS/MS, gas chromatography coupled with mass spectrometry – GC-MS) are used for the detection of psilocin; these techniques achieve a detection limit ranging from 0.5–52 ng/ml for blood and 0.5–18 ng/ml for urine (Hasler, Bourquin, Brenneisen, Bar, Vollenweider, 1996; Lindenblatt, Kramer, Holzmann-Erens, Gouzoulis-Mayfrank, Kovar, 1998; Kaferstein, Sticht, 2000; Kamata, Nishikawa, Katagi, Tsuchihashi, 2003, 2006).

The above described methods focus on the analysis of individual groups of substances, usually in one type of biological material. The presented extraction procedures are often labour-intensive, requiring large amounts of reagents and test material. Therefore, a need has arisen for developing a sufficiently sensitive, one-step screening analysis method for all the above-mentioned substances.

2. Methodology and reagents

2.1. Reagents

Muscarine, α -amanitin, and β -amanitin were ordered from Sigma-Aldrich; psilocin and psilocin-D₁₀ were ordered from Ceriliant; γ -amanitin was purchased from Symbios; acetonitrile (ACN), methanol, and formic acid were purchased from Sigma-Aldrich. Oasis Waters HLB 3cc 60 mg columns were purchased from Waters. Blood was obtained from the Regional Centre for Blood Donation and Haemotherapy (*Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa*) in Kraków and urine was collected from volunteers (laboratory workers).

2.2. Preparation of samples

Blood and urine samples for analysis were brought to room temperature. 0.5 ml of blood or urine, 2 ml of distilled water in the case of blood samples, and 10 μ l of psilocin-D₁₀ internal standard at a concentration of 5 μ g/ml were added to a 5 ml vial. The vial was then sealed and the contents mixed on a vortex mixer, after which they were allowed to stand for 30 minutes. The thus prepared samples were extracted to solid phase using Oasis HLB 3cc Vac Cartridges 60 mg. The cartridges were first conditioned with 1 ml ACN with formic acid (0.1%) and 1 ml distilled water. The samples were then added to the cartridges and washed with 1 ml of distilled water and 1 ml of methanol. The analytes were eluted with 1 ml of ACN with formic acid (0.1%). The eluate, collected in a 2 ml vial, was centrifuged and the supernatant was transferred to a 1.5 ml glass vial. The samples were placed in a heating block and evaporated in a stream of air at 25°C. Immediately before analysis, 100 μ l of mobile phase (v/v – 1/10) was added to the dry residue in the vial and mixed on a shaker (about 10 min). The solution was transferred to a polypropylene insert placed in the vial. The above sample preparation scheme was developed by improving an already existing method (Tanahashi et al., 2010).

2.3. LC-MS analysis

The analysis was carried out using Agilent 6546 LC/Q-TOF apparatus. A Kinetex 2.6 μ m C18 100 A LC Column 100 \times 4.6 mm and a precolumn with the same stationary phase were used to separate the analysed substances. The chromatographic conditions were as follows: flow rate 0.5 ml/min, column temperature 25°C, dispensing volume 10 μ l, mobile phase

A – water with formic acid (0.1%), mobile phase B – acetonitrile with formic acid (0.1%). The gradient program used in the analysis is shown in Table 2. The conditions of Q-TOF analysis were as follows: ion source Dual AJS ESI, positive polarization, fragmentor energy 150 V, Dual AJS ESI 4000 V capillary voltage, capillary temperature 325°C, reference ion masses – m/z 121.05087 and m/z 922.00979, mass range – m/z 20–1000.

Table 2
Mobile phase gradient

Time [min].	A [%]	B [%]	Flow rate [ml/min]
0.0	80	20	0.50
1.0	70	30	0.50
5.0	50	50	0.50
10.0	30	70	0.50
15.0	20	80	0.50
16.0	50	50	0.50
20.0	80	20	0.50

2.4. Data analysis

The analysis of the obtained results was performed with the use of the Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10 program. The compounds were identified with the use of the authors' mass spectrum library. The m/z values of the searched ions were respectively: 918.35379 for α -amanitin, 919.33946 for β -amanitin, 902.35678 for γ -amanitin, 174.14929 for muscarine, 204.12596 for psilocin and 214.18912 for psilocin-D₁₀ (Table 3).

Table 3
Analytical database for the analytes

Name	Formula	Mass [g/mol]	Retention time [min]
α -amanitin	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₄ S	918.35379	1.97
β -amanitin	C ₃₉ H ₅₃ N ₉ O ₁₅ S	919.33946	1.97
muscarine	C ₉ H ₂₀ NO ₂	174.14929	1.59
psilocin	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	204.12596	1.93
γ -amanitin	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₃ S	902.35678	1.97
psilocin-D ₁₀	C ₁₂ H ₆ D ₁₀ N ₂ O	214.18912	1.87

In order to increase selectivity and limit false positives, verification was implemented by comparing the obtained analyte retention time with the retention time found in the database. In addition, a mass tolerance

of ± 5 ppm and a retention time tolerance of ± 0.35 minutes were accepted. To obtain estimated m/z value and retention time under real conditions, 10 samples were prepared containing a mixture of the analytes in a blood sample with concentrations of 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, and 20 ng/ml. Two samples were prepared for each concentration. Averaging the obtained results, values of m/z and retention time were calculated for all analyzed substances (Table 3). Chromatograms of the analyzed substances at the concentration of 5 ng/ml in blood and detailed data from the chromatograms are included in a later part of the paper (Fig. 16, Table 4).

3. Validation of the method

The validation of the method was carried out according to the ANSI/ASB Standard 036 guidelines (ANSI/ASB, 2019). For this purpose, a total of 12 samples were prepared. Blood containing no relevant analytes and blood spiked with analytes at respective concentrations of 1 ng/ml, 5 ng/ml and 10 ng/ml were added to six vials; each sample was prepared twice. Additionally, a solution of muscarine was prepared at a concentration of 100 ng/ml in blood without the addition of other analytes. Urine samples were prepared similarly. Each of the samples was then subjected to LC-MS analysis three times. From the obtained results, the relationship between the peak heights of the analysed substances and the peak height of the internal standard psilocin-D₁₀ was drawn up. From this relationship, the standard deviation of the mean was calculated and curves were drawn for blood samples as shown in Figs. 6–10, and for urine samples as shown in Figs. 11–15. The standard deviation of the mean (for N = 6) is indicated on the curves.

3.1. Detection limit

Based on the value of the standard deviation of the set of signals and the angle of inclination of the calibration curve, detection limits (LOD) were determined using the relationship $LOD = (3.3 \times s)/b$, where s is the value of standard deviation, and b is the slope of the line. The LODs for α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, muscarine and psilocin were, respectively: 1.4 ng/ml, 0.3 ng/ml, 1.2 ng/ml, 1.8 ng/ml, and 0.3 ng/ml in blood, and 1.5 ng/ml, 2.1 ng/ml, 1.5 ng/ml, 1.6 ng/ml, and 1.1 ng/ml in urine.

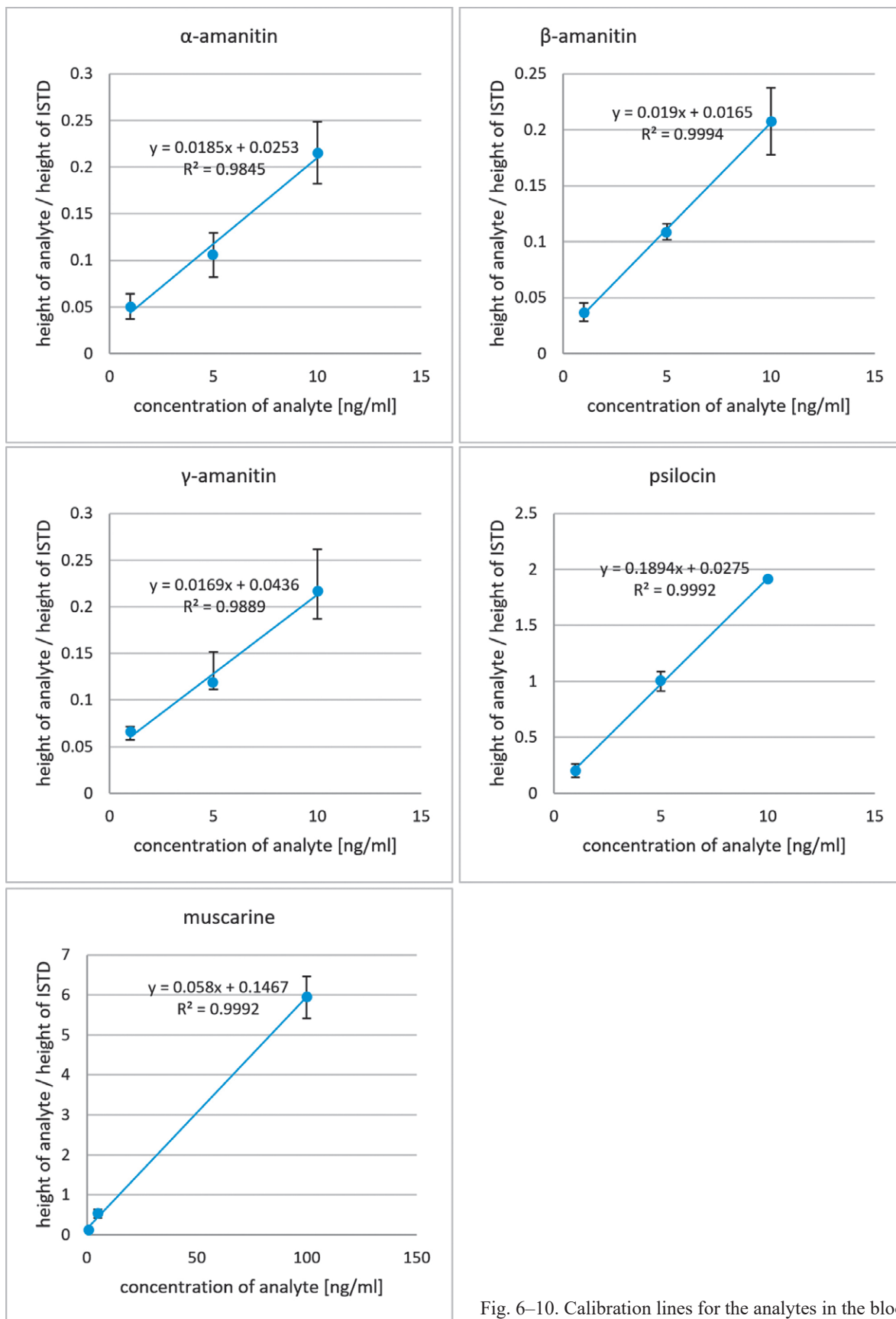


Fig. 6–10. Calibration lines for the analytes in the blood.

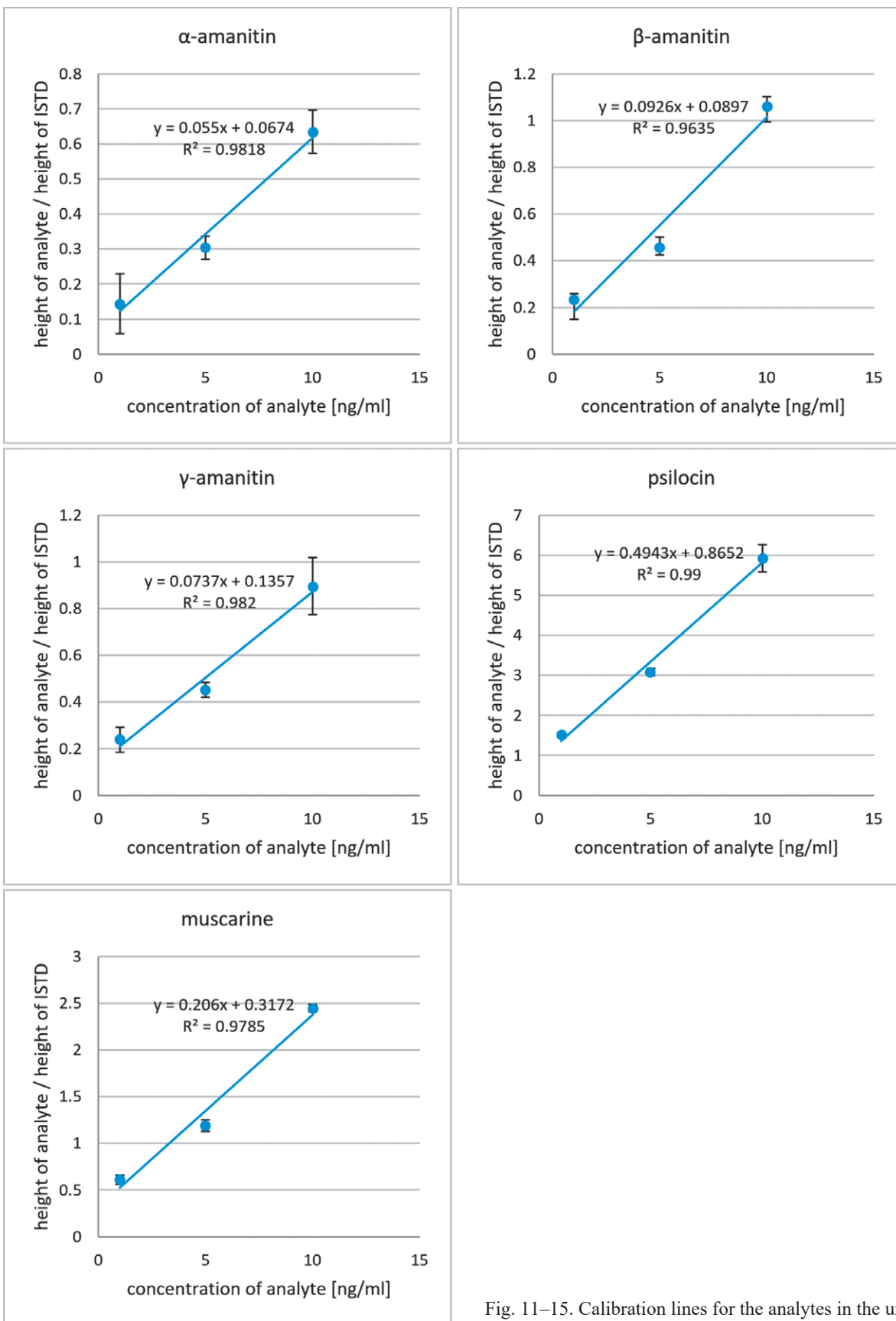


Fig. 11–15. Calibration lines for the analytes in the urine.

3.2. Transfer of sample

Four samples were prepared: two (one blood and one urine sample) contained a mixture of the analysed compounds at a concentration of 200 ng/ml, one was a blank blood sample and one a blank urine sample. The samples were analysed instrumentally, first analysing the sample containing the mixture of standards and then the blank sample. Measurements were repeated three times for the blood and urine samples. No transfer exceeding the LOD value was observed in any sample.

3.3. Interferences

In order to verify the presence of potential matrix interferences, the selectivity of the method was determined by analysing 10 blood and urine samples without an internal standard. The presence of interferences with masses similar to those of the analytes was not demonstrated. Instrumental analysis of two blank blood and urine samples containing psilocin-D₁₀ internal standard was also prepared and performed.

No interference between the internal standard and the analytes included in the method was demonstrated.

To check for potential interferences originating from other common analytes, the For Tox PCDL B.07.01 library of 9200 compounds was searched for compounds with masses close to the exact mass of the analytes with a mass tolerance of ± 5 ppm. No other compounds were found that could interfere with the analytes.

To determine the matrix effect, a sample containing standards of all the analysed substances was prepared in 100 μ l of mobile phase (v/v – 1/10) at a concentration of 5 ng/ml; furthermore, 10 each of blood and urine samples without internal standard were prepared and subjected to extraction, and then the standards of the analyzed substances were added to them so that their concentration was 5 ng/ml. Using the relationship $Y(\%) = (\bar{X}_2/\bar{X}_1) \times 100\%$, where Y – ionization enhancement or suppression, \bar{X}_2 – average value of the surface area of the analysed substance in the blood sample with addition of the standard, \bar{X}_1 – average value of the surface area of the analysed substance in the mobile phase sample with addition of the standard.

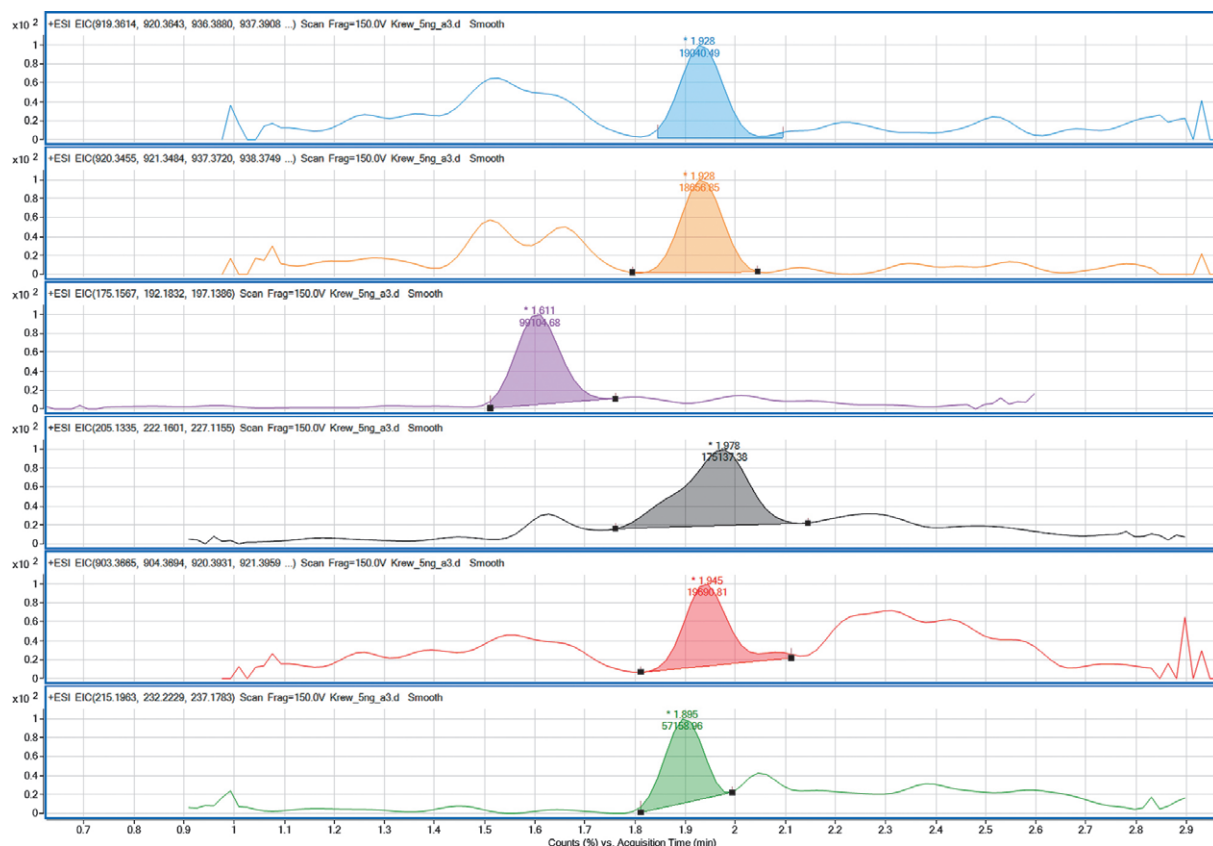


Fig. 16. The chromatograms of the extracted blood sample with 5 ng/ml of α -amanitin, β -amanitin, muscarine, psilocin, γ -amanitin, and psilocin-D₁₀.

The matrix effect was determined for α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, muscarine, psilocin and psilocin-D₁₀, which was 34%, 45%, 38%, 20%, 8%, and 55% in blood, respectively, and 40%, 38%, 34%, 30%, 70%, and 80% in urine, respectively. The reason for such a high matrix effect is the presence of polar compounds, naturally occurring in blood and urine, having retention times similar to those of the analytes. Due to the high suppression of ionization, the actual detection limit was assumed to be about 5 ng/ml.

Table 4
Chromographic data for the analytes obtained from Fig. 16

Compound	Retention time [min]	Peak area
α -amanitin	1.93	19040
β -amanitin	1.93	18656
muscarine	1.61	99104
psilocin	1.98	175137
γ -amanitin	1.95	19690
psilocin-D ₁₀	1.89	57158

4. Conclusions

The aim of this study was to develop a simple and sufficiently sensitive screening method for the analysis of α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, muscarine and psilocin in blood and urine samples. Although many methods exist for the analysis of these compounds individually using the LC-MS technique in biological material, the developed method is the first to encompass such a broad spectrum of fungal poisons. In the case of the available methods for the analysis of amanitins, most of them focus on the analysis of α -amanitin and β -amanitin, omitting γ -amanitin. The method presented here allows a simple, simultaneous qualitative analysis of α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, muscarine and psilocin in blood and urine, and the detection limits achieved are competitive in relation to the already existing more complex methods. However, special attention should be paid to the high suppression of ionization, which may negatively affect the detectability of substances. Regardless of this, we can conclude that the developed method has a sufficiently low detection limit to be used for blood and urine screening analyses for the presence of naturally occurring compounds in fungi.

References

- Abbott, N. L., Hill, K. L., Garrett, A., Carter, M. D., Hamelin, E. I., Johnson, R. C. (2018). Detection of α -, β -, and γ -amanitin in urine by LC-MS/MS using ¹⁵N₁₀- α -amanitin as the internal standard. *Toxicol*, 52, 71–77.
- ANSI/ASB Standard 036. First edition (2019). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology.
- Belliardo, F., Massano, G. (1983). Determination of α -amanitin in serum by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography*, 6(3), 551–558.
- Bojko, P. (2014). Psylocybina. Retrieved March 19, 2020 from <http://knmn.us.edu.pl/teksty/nauka/386--psylocybina>.
- Bresinsky, A. (1990). *A colour atlas of poisonous fungi: A handbook for pharmacists, doctors, and biologists*. London: Wolfe Publishing.
- Burda, P. (1998). *Zatrucia ostre grzybami i roslinami wyzszyimi*. Warszawa: PWN.
- Burda, P., Ciszowski, K. (2009). Grzyby trujace. (In) J. Pach (Ed.), *Zarys toksykologii klinicznej* (pp. 545–574). Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego.
- Catalfomo, P., Eugster, C. H. (1970). Muscarine and muscarine isomers in selected inocybe species. *Helvetica*, 53(4), 848–851.
- Ciszowski, K. (2020). Trucizny grzybowe majace znaczenie w Polsce. (In) K. Jurowski, W. Piekoszewski (Eds.), *Toksykologia II* (pp. 93–103). Warszawa: Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich.
- Dydak, K., Śliwińska-Mossoń, M., Milnerowicz, H. (2015). Psylocibin – public available psychodysleptic. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 69, 986–995.
- Faulstich, H., Talas, A., Wellhöner, H. H. (1985). Toxicokinetics of labeled amatoxins in the dog. *Archives of Toxicology*, 56, 190–194.
- Feng, L., Tan, L., Li, H., Xu, Z., Shen, G., Tang, Y. (2015). Selective fluorescent sensing of α -amanitin in serum using carbon quantum dots-embedded specificity determinant imprinted polymers. *Biosens Bioelectron*, 69, 265–271.
- Filigenzi, M. S., Poppenga, R. H., Tiwary, A. K. (2007). Determination of alpha-amanitin in serum and liver by multistage linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 2784–2790.
- Geschwinde, T. (2003). *Marktformen und Wirkungsweisen*. Berlin: Springer.
- Ginterová, P., Sokolová, B., Ondra, P., Znalezona, J., Petr, J., Ševčík, J., Maier, V. (2014). Determination of mushroom toxins ibotenic acid, muscimol and muscarine by capillary electrophoresis coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, 125, 242–247.
- Główny Inspektor Sanitarny. *Raport stanu sanitarnego kraju 2010–2018*. Retrieved January 11, 2020 from <https://www.gov.pl/>.
- Gonmori, K., Fujita, H., Yokoyama, K., Watanabe, K., Suzuki, O. (2011). Mushroom toxins: A forensic toxicological review. *Forensic Toxicology*, 29, 85–94.

18. Hall, I., Stephenson, S., Buchanan, P., Yun, W., Cole, A. (2003). *Edible and poisonous mushrooms of the world*. Portland: Timber Press.
19. Hasler, F., Bourquin, D., Brenneisen, R., Bär, T., Vollenweider, F. X. (1996). Determination of psilocin and 4-hydroxyindole-3-acetic acid in plasma by HPLC-ECD and pharmacokinetic profiles of oral and intravenous psilocybin in man. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 72(3), 175–184.
20. Hasler, F., Bourquin, D., Brenneisen, R., Vollenweider, F. X. (2002). Renal excretion profiles of psilocin following oral administration of psilocybin: A controlled study in man. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(2), 331–339.
21. Hofman, A., Heim, R., Brack, A., Kobel, H., Frey, A., Ott, H., Petrzilka, T. H., Troxler, F. (1959). Psilocybin und Psilocin, zwei psychotrope Wirkstoffe aus mexikanischen Rauschpilzen. *Helvetica*, 42(5), 1557–1572.
21. Horita, A., Weber, L. J. (1961). The enzymic dephosphorylation and oxidation of psilocybin and psilocin by mammalian tissue homogenates. *Biochemical Pharmacology*, 7(1), 47–54.
22. Jaeger, A., Jehl, F., Flesch, F., Sauder, P., Kopferschmitt, J. (1993). Kinetics of amatoxins in human poisoning: therapeutic implications. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 31(1), 63–80.
23. Jasicka-Misiak, I., Młynarz, P., Kafarski, P. (2006). *Identyfikacja grzybów halucynogennych ze wskazaniem najpowszechniej stosowanych metod oznaczania substancji halucynogennych z grzybów we krwi*. Retrieved March 19, 2020 from http://www.biotech.dcz.t.wroc.pl/opracowania_merytoryczne.xml.
24. Jehl, F., Gallion, C., Brickel, P., Jaeger, A., Flesch, F., Minck, R. (1985). Determination of α -amanitin and β -amanitin in human biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 149(1), 35–42.
25. Kamata, T., Nishikawa, M., Katagi, M., Tsuchihashi, H. (2006). Direct detection of serum psilocin glucuronide by LC/MS and LC/MS/MS: Time-courses of total and free (unconjugated) psilocin concentrations in serum specimens of a “magic mushroom” user. *Forensic Toxicology*, 24, 36–40.
26. Kamata, T., Nishikawa, M., Katagi, M., Tsuchihashi, H. (2003). Optimized glucuronide hydrolysis for the detection of psilocin in human urine samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 796(2), 421–427.
27. Lampe, F. K. (2018). Mushroom poisoning. (In) M. Rechcigl (Ed.), *Handbook of naturally occurring food toxicants* (pp. 193–213). London: CRC Press.
28. Leite, M., Freitas, A., Azul, A. M., Barbosa, J., Costa, S., Ramos, F. (2013). Development, optimization and application of an analytical methodology by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of amanitins in urine and liver samples. *Analytica Chimica Acta*, 799, 77–87.
29. Lindenblatt, H., Krämer, E., Holzmann-Erens, P., Gouzoulis-Mayfrank, E., Kovar, K. A. (1998). Quantitation of psilocin in human plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection: comparison of liquid-liquid extraction with automated on-line solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 708(2), 255–263.
30. Magdalan, J. (2010). Mechanizmy hepatotoksyczności α -amanityny oraz porównanie skuteczności odtrutek stosowanych w terapii zatruc \acute{e} muchomorem sromotnikowym – przegląd bada \acute{n} na hodowlach komórkowych. *Postępy Biologii Komórki*, 37(3), 525–537.
31. Malone, M. H., Brown, J. K., Stuntz, D. E., Tayler, V. (1962). Paper chromatographic determination of muscarine in *Inocybe* species. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(9), 853–856.
32. Marciniak, B., Ferenc, T., Kusowska, J., Cieciewicz, J., Kowalczyk, E. (2010). Zatrucia wybranymi grzybami o działaniu neurotopowym i halucynogennym. *Medycyna Pracy*, 61, 583–595.
33. Martin, R., Schürenkamp, J., Pfeiffer, H., Köhler, H. (2012). A validated method for quantitation of psilocin in plasma by LC-MS/MS and study of stability. *Journal of Legal Medicine*, 126(6), 845–849.
34. Maurer, H. H., Schmitt, C. J., Weber, A. A., Kraemer, T. (2000). Validated electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric assay for the determination of the mushroom toxins α - and β -amanitin in urine after immunoaffinity extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 748(11), 125–135.
35. Merová, B., Ondra, P., Staňková, M., Sural, M., Stříbrný, J., Hebká, L., Lemr, K. (2011). Determination of muscarine in human urine by electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(25), 2549–2553.
36. Oslon, K. (2011). *Poisoning and drug overdose*, Sixth edition. New York: McGraw-Hill Medical.
37. Sticht, G., Käferstein, H. (2000). Detection of psilocin in body fluids. *Forensic Science International*, 113, 403–407.
38. Tanahashi, M., Kaneko, R., Hirata, Y., Hamajima, M., Arinobu, T., Ogawa, T., Ishii, A. (2010). Simple analysis of α -amanitin and β -amanitin in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, 28, 110–114.
39. Walton, J. (2018). *The cyclic peptide toxins of amanitina and other poisonous mushrooms*. East Lansing: Springer.

Corresponding author

Bartłomiej Feigel
Institute of Forensic Research
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: bfeigel@ies.gov.pl

PRZESIEWOWA METODA BADANIA KRWI ORAZ MOCZU NA OBECNOŚĆ ZWIĄZKÓW TOKSYCZNYCH NATURALNIE WYSTĘPUJĄCYCH W GRZYBACH METODĄ LC-MS

1. Wstęp

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat różnorodność grzybów, które można kupić w sklepach czy zjeść w restauracjach, diametralnie się zwiększyła. Częstsze ich spożycie nie dotyczy tylko odmian uprawnych, ale również tych, które można uzyskać w środowisku naturalnym. W Chinach, Japonii oraz Europie istnieje mocno zakorzeniona tradycja samodzielnego zbierania i spożywania grzybów. Jest ona wspierana licznymi ilustrowanymi publikacjami zawierającymi zdjęcia i informacje na temat toksyczności grzybów (Hall, Stephenson, Buchanan, Wang, Cole, 2003; Lampe, 2018; Walton, 2018).

Zatrucia grzybami wynikają głównie z przyjęcia zawartych w nich toksyn. W Polsce mimo powszechnego dostępu do informacji dotyczących trujących gatunków grzybów i głęboko zakorzenionej tradycji grzybobrania liczba zatruc wciąż pozostaje na wysokim poziomie (Ryc. 1). Powodują one różne objawy, jednak do najczęstszych zalicza się zaburzenia żołądkowo-jelitowe powodujące biegunkę, nudności, bóle brzucha i wymioty. Można je podzielić na wczesne, późne i bardzo późne. Różnią się one czasem wystąpienia objawów od momentu spożycia trujących gatunków grzybów. Symptomy zatruc wczesnych pojawiają się po ok. 6 h, późnych między 6–24 h, bardzo późnych po czasie przekraczającym 24 h.

Najczęstszym powodem zatruc jest przypadkowe spożycie trujących grzybów, co może być skutkiem braku wiedzy lub zwykłej pomyłki. Muchomor sromotnikowy może zostać pomyłony z gołąbkim zielonym, kanią czy pieczarką. Strzępiak ceglasty przypomina gąskę wiosenną lub niektóre gatunki pieczarek. Piestrzenicę kasztanową można pomylić ze smardzem jadalnym (Marciniak, Ferenc, Kusowska, Cieciewicz, Kowalczyk, 2010; Gonmori, Fujita, Yokoyama, Watanabe, Suzuki, 2011; Pach, 2009). Prawie wszystkie trujące grzyby z wyłączeniem borowików mają blaszki pod kapeluszem, co ułatwia ich rozróżnianie (Marciniak i in., 2010). Do najbardziej niebezpiecznych grzybów zalicza się gatunki z rodzaju wierzuski, zasłoniaka, muchomora, piestrzenicy, strzępiaka, hełmówki, gąski, lejkówki, krowiaka i czubajki (Burda, 1998; Ciszowski, 2020). Substancje w nich zawarte mają bardzo szerokie działanie toksyczne. Po ich spożyciu może dojść do uszkodzeń wątroby lub nerek, nieodwracalnych uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego, a w cięższych przypadkach zaburzeń układu pokarmowego (Burda, 1998).

Ze względu na swą ogólnodostępność grzyby mogą zostać wykorzystane do spowodowania celowego uszczerbku na zdrowiu lub zabójstwa. Nie można również pominąć świadomego spożywania gatunków zawierających związki psychoaktywne. Grzyby tego typu występują również w Polsce, są stosunkowo łatwo dostępne, a efekty spowodowane ich spożyciem silnie zaznaczają się w strefie psychicznej – mogą prowadzić do zaburzeń percepcji, zmian nastroju czy halucynacji.

Amatoksyny są najsilniej działającymi toksynami pochodzącymi od grzybów (Tabela 1). Wykazują hepatotoksyczność wywołującą prowadzącą do śmierci piorunującą niewydolność wątroby (Burda, 1998; Ciszowski, 2020). Zaliczamy do nich α -amanitynę, β -amanitynę, γ -amanitynę, ϵ -amanitynę, proamanulinę, amanulinę, kwas amanulinowy, amaninę, amaninamid, najbardziej istotne względem niniejszej pracy zostały ujęte na rycinie 2. Wśród wymienionych amanityn najsilniejsze właściwości toksyczne wykazuje α -amanityna. Jej wysoka temperatura rozkładu wynosząca ponad 254°C sprawia, że żadna forma obróbki kulinarnej nie powoduje jej inaktywacji. Do organizmu ludzkiego wchłania się z przewodu pokarmowego, jest wykrywalna we krwi po 30 minutach od spożycia, a wydalana jest wraz z moczem przez kolejne 72 godziny. Jej stężenie we krwi gwałtownie spada przez kolejne 36 godzin, po których szansa na wykrycie tej toksyny we krwi gwałtownie maleje. Spośród krążących we krwi amanityn aż do 57% z nich może zostać wychwycone przez wątrobę (Faulstich, Talas, Wellhöner, 1985; Filigenzi, Poppenga, Tiwary, 2007; Magdalan, 2010). Następnie dzięki polipeptydowi transportującemu aniony organiczne przedostają się one do komórek wątroby, gdzie łączą się z polimerazą II RNA. Skutkiem tego procesu jest zahamowanie transkrypcji, a następnie syntezy białek, co prowadzi do śmierci komórek wątroby (Filigenzi i in., 2007; Oslon, 2011; Walton, 2018).

Najczęstszym powodem zatruc muskarynowych jest przypadkowe spożycie grzybów zawierających muskarynę, do których należą grzyby z gatunku strzępiakowatych. Objawy zatrucia wywołanego tą toksyną pojawiają się w przedziale 30–120 minut od spożycia (Bresinsky, 1990). Przyjęta do organizmu ludzkiego muskaryna (Ryc. 3) wiąże się z receptorami acetylocholino, powodując pojawienie się zespołu charakterystycznych objawów, takich jak ślinotok, zwężenie źrenic, pocenie się oraz bradykardia (Malone, Brown, Stuntz, Tayler, 1962; Burda, 1998; Catalfomo, Eugster, 1970).

Psylocyna i psylocybina są substancjami psychoaktywnymi, naturalnie występującymi w grzybach z gatunków *Psilocybe semilanceata*, *Psilocybe mexicana*, *Psilocibe cubensis*, *Psilocibe azurescens* (Dydak, Śliwińska-Mossoń, Milnerowicz, 2015; Geschwinde, 2003; Horita, Weber, 1961; Jasicka-Misiak, Młynarz, Kafarski, 2006; Martin, Schürenkamp, Pfeiffer, Köhler, 2011). Pierwsze objawy pojawiają się między 10 a 30 minutą po spożyciu. Należą do nich zawroty głowy, zaburzenie koordynacji oraz poszerzenie źrenic. Do najbardziej charakterystycznych objawów występujących po około 30 minutach od spożycia zaliczamy zaburzenia postrzegania, zaburzone poczucie upływu czasu, wypaczone odczucie własnego ciała. Efekt działania trwa przez 4 do 8 godzin (Pach, 2009). Zarówno psylocyna, jak i psylocybina mają budowę chemiczną podobną do serotoniny (Ryc. 4), a za działanie psychoaktywne odpowiedzialne jest ich powinowactwo do receptorów serotoninowych (Bojko, 2014).

Spożyta psylocybina ulega defosforylacji do psylocyny (Ryc. 5) będącej substancją farmakologicznie czynną (Horita, Weber, 1961).

W tabeli 1 umieszczono informacje na temat dawek śmiertelnych analizowanych substancji, w przypadku psylocyny, kwasu ibotenowego i muscymolu brak jest odpowiednich danych w piśmiennictwie.

Opracowano wiele metod wykrywania amanityny we krwi oraz moczu. Starsze publikacje skupiają się na wykrywaniu α -amanityny oraz β -amanityny z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Opisane metody zużywają duże ilości odczynników i analizowanego materiału biologicznego, ich limit detekcji wynosi około 10 ng/ml (Belliaro, Massano, 1983; Jehl i in., 1985; Jaeger, Jehl, Flesch, Sauder, Kopferschmitt, 1993). Praca wydana w 2000 roku przez Maurera i in. opisuje wykrywanie α -amanityny oraz β -amanityny w moczu z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS). Metoda ta posiada zadowalający limit detekcji wynoszący 5 ng/ml dla obu analizowanych związków. Procedura ekstrakcji jest jednak skomplikowana, wymaga wykorzystania kolumn powinowactwa immunologicznego, inkubacji, zużywa także duże ilości analizowanego materiału biologicznego (Maurer, Schmitt, Weber, Kraemer, 2000). W kolejnych publikacjach, ukazujących się w latach 2010–2018, mowa jest o tym, że osiągnięto o wiele lepsze limity detekcji, wynoszące 0,22–10 ng/ml dla α -amanityny i 0,20–10 ng/ml dla β -amanityny we krwi i moczu (Abbott i in., 2018; Tanahashi i in., 2010; Azul, 2013; Feng i in., 2015). γ -amanityna została uwzględniona tylko w metodzie opisanej w 2018 roku, w której limit detekcji został wyznaczony na 0,169 ng/ml w moczu (Abbott i in., 2018). Do wykrywania muskaryny wykorzystywane są różne techniki sprzężone (LC-MS, elektroforeza kapilarna sprzężona ze spektrometrią mas – CE-ESI-MS/MS), a ich limit detekcji waha się

w przedziale od 0,09 do 0,73 ng/ml. Badanym materiałem biologicznym był mocz (Ginterová i in., 2014; Merová i in., 2011). Do wykrywania psylocyny wykorzystywane są różne techniki chromatograficzne (HPLC, LC-MS, LC-MS/MS, chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas – GC-MS), które osiągają limit detekcji wahający się w przedziale 0,5–52 ng/ml dla krwi oraz 0,5–18 ng/ml dla moczu (Hasler, Bourquin, Brenneisen, Bar, Vollenweider, 1996; Lindenblatt, Kramer, Holzmann-Erens, Gouzoulis-Mayfrank, Kovar, 1998; Kaferstein, Sticht, 2000; Kamata, Nishikawa, Katagi, Tsuchihashi, 2003, 2006).

Wyżej opisane metody skupiają się na analizie pojedynczych grup substancji, zwykle w jednym rodzaju materiału biologicznego. Przedstawione procedury ekstrakcji są często pracochłonne, wymagają dużych ilości odczynników i materiału badanego. Dlatego zaistniała potrzeba stworzenia dostatecznie czulej, jednoetapowej metody analizy przesiewowej dla wszystkich powyżej wymienionych substancji.

2. Metodyka i odczynniki

2.1. Odczynniki

Muskaryna, α -amanityna i β -amanityna zostały zamówione w Sigma-Aldrich, psylocynę i psylocyę- D_{10} zamówiono z firmy Cerilant, γ -amanitynę kupiono w Symbios, acetonitryl (ACN), metanol, kwas mrówkowy w Sigma-Aldrich. Kolumny Oasis Waters HLB 3cc 60 mg nabyto w firmie Waters. Krew pozyskano z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Krakowie, a mocz pobrano od ochotników (pracowników laboratorium).

2.2. Przygotowanie próbek

Próbki krwi i moczu przeznaczone do badań zostały doprowadzone do temperatury pokojowej. Do fiolki o pojemności 5 ml dodano 0,5 ml krwi lub moczu, 2 ml wody destylowanej w przypadku próbek krwi, 10 μ l wzorca wewnętrznego psylocyny- D_{10} o stężeniu 5 μ g/ml. Fiolkę następnie zamykano, a jej zawartość zmieszano na wortexie, po czym pozostawiono na 30 minut. Tak przygotowane próbki zostały poddane ekstrakcji do fazy stałej z wykorzystaniem kolumnienek Oasis HLB 3cc Vac Cartridge 60 mg. Kolumnienki najpierw kondycjonowano za pomocą 1 ml ACN z kwasem mrówkowym (0,1%) i 1 ml wody destylowanej. Następnie dozowano badane próbki. Złoże przemywano 1 ml wody destylowanej i 1 ml metanolu. Anality eluowano 1 ml ACN z kwasem mrówkowym (0,1%). Zebrany do fiolki o pojemności 2 ml eluat odwirowano, a supernatant przenoszono do szklanej fiolki na 1,5 ml. Próbki umieszczono

w bloku grzewczym i odparowano w strumieniu powietrza w temp. 25°C. Bezpośrednio przed analizą do suchej pozostałości w fiołce dodano 100 µl fazy ruchomej (v/v – 1/10) i zmieszano na wytrząsarce (ok. 10 min). Roztwór przeniesiono do polipropylenowej wkładki umieszczonej w fiołce. Powyższy schemat przygotowania próbek został opracowany poprzez usprawnianie już istniejącej metody (Tanahashi i in., 2010).

2.3. Analiza LC-MS

Analiza została przeprowadzona przy użyciu aparatu Agilent 6546 LC/Q-TOF. Do rozdzielania analizowanych substancji użyto kolumny Kinetex 2,6 µm C18 100 A LC Column 100 × 4,6 mm oraz prekolumny o takim samym wypełnieniu. Warunki chromatograficzne były następujące: natężenie przepływu 0,5 ml/min, temperatura kolumny 25°C, objętość dozowania 10 µl, faza ruchoma A – woda z kwasem mrówkowym (0,1%), faza ruchoma B – acetonitryl z kwasem mrówkowym (0,1%). Program gradientowy wykorzystany w analizie został przedstawiony w tabeli 2. Warunki analizy Q-TOF to: źródło jonów Dual AJS ESI, polaryzacja dodatnia, energia fragmentora 150 V, napięcie kapilary Dual AJS ESI 4000 V, temperatura kapilary 325°C, masy jonów referencyjnych m/z 121,05087 oraz m/z 922,00979, zakres mas m/z 20–1000.

2.4. Analiza danych

Analiza uzyskanych wyników przeprowadzona została z zastosowaniem programu Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10. Związki zidentyfikowane były za pomocą autorskiej biblioteki. Wartości m/z poszukiwanych jonów wynosiły odpowiednio: 918,35379 dla α-amanityny, 919,33946 dla β-amanityny, 902,35678 dla γ-amanityny, 174,14929 dla muskaryny, 204,12596 dla psylocyny i 214,18912 dla psylocyny-D₁₀ (Tabela 3).

Aby zwiększyć selektywność i ograniczyć liczbę fałszywie pozytywnych wyników, wprowadzono weryfikację przez porównanie uzyskanego czasu retencji analitu z czasem retencji znajdującym się w bazie danych. Dodatkowo przyjęto tolerancję masy na poziomie ±5 ppm i czasu retencji na poziomie ±0,35 minuty. W celu uzyskania szacowanej wartości m/z i czasu retencji w warunkach rzeczywistych przygotowano 10 próbek zawierających mieszaninę analizowanych związków w próbce krwi o stężeniach 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml. Dla każdego stężenia zostały przygotowane dwie próbki. Uśredniając uzyskane wyniki, obliczono wartości m/z i czasu retencji dla wszystkich analizowanych substancji (Tabela 3). Chromatogramy analizowanych substancji w stężeniu 5 ng/ml we krwi oraz szczegółowe dane z chromatogramów zostały umieszczone w dalszej części pracy (Ryc. 16, Tabela 4).

3. Walidacja metody

Walidacja metody została przeprowadzona zgodnie z wytycznymi ANSI/ASB Standard 036 (ANSI/ASB, 2019). W tym celu przygotowano łącznie 12 próbek. Do sześciu fiołek dodano krew niezawierającą przedmiotowych analitów i w odpowiednich stężeniach analizowanych substancji wynoszących 1 ng/ml, 5 ng/ml i 10 ng/ml; każda próbka została sporządzona dwa razy. Dodatkowo przygotowano roztwór muskaryny o stężeniu 100 ng/ml we krwi bez dodatku innych analitów. Analogicznie przygotowane zostały próbki moczu. Każdą z próbek poddano następnie trzykrotnej analizie LC-MS. Z uzyskanych wyników sporządzono zależność stosunków wysokości pików analizowanych substancji do wysokości pików standardu wewnętrznego psylocyny-D₁₀. Z zależności tej obliczono odchylenie standardowe średniej i sporządzono krzywe dla próbek krwi, co przedstawiono na rycinach 6–10, a dla moczu – na rycinach 11–15. Na krzywych zaznaczono odchylenie standardowe średniej (dla N = 6).

3.1. Limit detekcji

Na podstawie wartości odchylenia standardowego zbioru sygnałów i kąta nachylenia krzywej kalibracyjnej wyznaczono limity detekcji (LOD), korzystając z zależności $LOD = (3,3 \times s)/b$, gdzie s to wartość odchylenia standardowego, b jest współczynnikiem kierunkowym prostej kalibracyjnej. LOD dla α-amanityny, β-amanityny, γ-amanityny, muskaryny i psylocyny, wynosiły odpowiednio: 1,4 ng/ml, 0,3 ng/ml, 1,2 ng/ml, 1,8 ng/ml, 0,3 ng/ml we krwi i 1,5 ng/ml, 2,1 ng/ml, 1,5 ng/ml, 1,6 ng/ml, 1,1 ng/ml w moczu.

3.2. Przeniesienie próbki

Przygotowano 4 próbki, dwie zawierające mieszaninę analizowanych związków o stężeniu 200 ng/ml, jedną próbkę ślepą krwi i jedną próbkę ślepą moczu. Probki poddano analizie instrumentalnej, najpierw analizując próbkę zawierającą mieszaninę wzorców, a następnie próbkę ślepą. Pomiary powtórzono trzykrotnie dla próbek krwi i moczu. W żadnej próbce nie stwierdzono przeniesienia przekraczającego wartość LOD.

3.3. Interferencje

W celu weryfikacji obecności potencjalnych interferencji matrycowych wyznaczono selektywność metody, poddając analizie 10 próbek krwi i moczu bez wzorca wewnętrznego. Nie wykazano obecności interferentów o masach zbliżonych do mas analitów. Przygotowano i wykonano analizę instrumentalną dwóch próbek ślepych krwi i moczu, zawierających wzorzec wewnętrzny

psylocyny- D_{10} . Nie wykazano interferencji między wzorcem wewnętrznym a analitami objętymi metodą.

W celu sprawdzenia możliwości wystąpienia potencjalnych interferencji pochodzących od innych często spotykanych analitów przeszukano zawierającą 9200 związków bibliotekę For Tox PCDL B.07.01 pod kątem wystąpienia w niej związków o masach zbliżonych do dokładnej masy analitów przy tolerancji na poziomie masy ± 5 ppm. Nie znaleziono żadnych innych związków mogących interferować z analizowanymi substancjami.

W celu wyznaczenia efektu matrycy przygotowano próbkę zawierającą wzorce wszystkich analizowanych substancji w 100 μ l fazy ruchomej (v/v – 1/10) o stężeniu 5 ng/ml oraz po 10 próbek krwi i moczu bez wzorca wewnętrznego, które zostały poddane ekstrakcji, następnie dodano do nich wzorce analizowanych substancji tak, by ich stężenie wynosiło 5 ng/ml. Korzystając z zależności $Y(\%) = (\bar{X}_2/\bar{X}_1) \times 100\%$, gdzie Y – wzmocnienie lub supresja jonizacji, \bar{X}_2 – uśredniona wartość pola powierzchni analizowanej substancji w próbce krwi z dodatkiem wzorca, \bar{X}_1 – uśredniona wartość pola powierzchni analizowanej substancji w próbce fazy ruchomej z dodatkiem wzorca, wyznaczono efekt matrycy dla α -amanityny, β -amanityny, γ -amanityny, muskaryny, psylocyny i psylocyny- D_{10} , który wyniósł odpowiednio 34%, 45%, 38%, 20%, 8%, 55% we krwi oraz 40%, 38%, 34%, 30%, 70%, 80% w moczu. Przyczyną tak wysokiego efektu matrycy jest obecność związków polarnych naturalnie występujących we krwi i moczu, ulegających retencji w czasie zbliżonym do czasu retencji substancji analizowanych. Ze względu na wysoką supresję jonizacji przyjęto, że rzeczywista granica wykrywalności wynosi około 5 ng/ml.

4. Wnioski

Celem badań było opracowanie prostej oraz wystarczająco czulej metody przesiewowej, służącej do analizy α -amanityny, β -amanityny, γ -amanityny, muskaryny i psylocyny w próbkach krwi oraz moczu. Mimo że istnieje wiele metod analizy tych związków z wykorzystaniem techniki LC-MS w materiale biologicznym, opracowana metoda jako pierwsza uwzględnia tak szerokie spektrum trucizn grzybowych. W przypadku dostępnych metod analizy amanityn większość skupia się na analizie α -amanityny i β -amanityny z pominięciem γ -amanityny. Przedstawiona w niniejszej publikacji metoda pozwala na prostą, jednoczesną analizę jakościową α -amanityny, β -amanityny, γ -amanityny, muskaryny i psylocyny we krwi oraz moczu, a osiągnięte limity detekcji są konkurencyjne w stosunku do już istniejących bardziej złożonych metod. Należy jednak zwrócić szczególną uwagę na wysoką supresję jonizacji, która może negatywnie wpływać na wykrywalność substancji. Niezależnie od

tego możemy stwierdzić, że opracowana metoda posiada wystarczająco niską granicę wykrywalności, by można ją było stosować do analiz przesiewowych krwi i moczu na obecność związków naturalnie występujących w grzybach.