



Werner Arnold, 21.10.2014

---

# **Bestimmung von $\alpha$ -Amanitin in Pilzen und klinischen Proben (Blut, Urin) mit LC-MS (MSQ-Plus)**

LS 2014-11

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Peptidtoxine als Giftstoffe der Knollenblätterpilze (Amanita-Arten) [1,2,3].....</b>	<b>3</b>
2.1. Vorkommen .....	3
2.2. Chemie .....	5
2.3. Pharmakologie .....	6
2.4. Vergiftungsfälle, Vergiftungssymptome und Behandlung von Vergiftungen .....	8
2.4.1. Vergiftungsunfälle .....	8
2.4.2. Vergiftungssymptome .....	9
2.4.3. Behandlung von Vergiftungen .....	9
<b>3. Quantitative Erfassung von <math>\alpha</math>-Amanitin (Methodik) .....</b>	<b>10</b>
<b>4. Experimenteller Teil – LC-MS-Messungen [6,7,8,9] .....</b>	<b>10</b>
4.1. Referenzmaterialien & Kalibrierlösungen .....	10
4.2. Instrumente und HPLC-MS-Bedingungen .....	11
4.3. Messungen mit Reinsubstanzen ( $\alpha,\beta$ -Amanitin und Phalloidin) .....	12
4.3.1. Spektren, Linearität und Nachweisgrenze (LOD) .....	12
4.4. Messung von $\alpha$ -Amanitin in Pilzen und Pilzgerichten .....	15
4.4.1. $\alpha$ -Amanitin gespikt in Zucht-Chapignons und in einem gekauften Pilzgericht .....	15
4.4.2. $\alpha$ -Amanitin in <i>Amanita Phalloides</i> (Grüner Knollenblätterpilz).....	16
4.4.3. $\alpha$ -Amanitin im Urin .....	17
4.4.4. $\alpha$ -Amanitin im Serum .....	19
<b>5. Diskussion / Ausblick .....</b>	<b>21</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>21</b>

### Anhang

Programm zur Steuerung des LC-MS-Gerätes  
 $\alpha$ -Amanitin – Product information (SIGMA-ALDRICH)

## 1. Zusammenfassung

Bei den Amanitinen, auch Amatoxinen, handelt es sich um zyklische Oligopeptide, genauer Octapeptide, da sie aus acht Aminosäuren aufgebaut sind. Das bekannteste Amatoxin ist das  $\alpha$ -Amanitin, das vor allem im Grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) zu finden ist.  $\alpha$ -Amanitin ist auf der NATO-Liste der gefährlichen Toxine aufgeführt. Es ist resistent gegen Kochen und wird auch nicht durch die Proteasen im Magentrakt zerlegt.

Amanitinvergiftungen sind immer lebensbedrohlich. Eine sichere und schnelle Bestätigung der Vergiftung ist deshalb sehr wichtig. Für den Menschen beträgt die letale Dosis von  $\alpha$ -Amanitin etwa 0.1 mg/kg. Amanitine hemmen die Transkription durch Blockade der RNA-Polymerase. Durch die Blockierung der Proteinbiosynthese ist vor allem die Leber betroffen.

Für den Nachweis von  $\alpha$ -Amanitin in Verdachts- und klinischen Proben wurde eine LC-MS Methode etabliert. Die Nachweisgrenze dieser Bestimmung liegt bei 5 ng/ml im Serum oder Urin.

In diesem Laborbericht werden die wichtigsten Versuche beschrieben und diskutiert. Die LC-MS-Detektion von  $\alpha$ -Amanitin wurde in der Arbeitsgruppe Toxinologie als nicht akkreditiertes Verfahren eingeführt.

## 2. Peptidtoxine als Giftstoffe der Knollenblätterpilze (Amanita-Arten) [1,2,3]

### 2.1. Vorkommen

Von den in Mitteleuropa zu findenden Knollenblätterpilzen enthalten der Grüne Knollenblätterpilz (*A. phalloides*), der Spitzhütige Knollenblätterpilz (*A. virosa*) und der Weisse Knollenblätterpilz (*A. verna*) hauptsächlich 2 Gruppen hochtoxischer Cyclopeptide, die Amatoxine und die Phallotoxine, die bei *Amanita virosa* von den Virotoxinen begleitet werden.

Andere Giftpilze aus der Gattung der Wülstlinge (*Amanita*), wie der Fliegenpilz (*Amanita muscaria*) und der Pantherpilz (*Amanita pantherina*), enthalten keine Amatoxine. Bei diesen Pilzen ist die Giftwirkung auf Ibotensäure und Muscimol zurückzuführen.



Grüner Knollenblätterpilz  
(*Amanita phalloides*)



Spitzhütiger Knollenblätterpilz  
(*Amanita virosa*)



Weisser Knollenblätterpilz  
(*Amanita verna*)

**Abb. 1:** Die wichtigsten Knollenblätterpilze (Quelle: Wikipedia)

Der Grüne Knollenblätterpilz, *Amanita phalloides*, besitzt einen grünlichen Hut mit einem Durchmesser von 4 bis 12 cm, weiße Blätter, eine auffällige Manschette und, wie alle *Amanita*-Arten, ein knolliges Stielende, das in einer scheidenartigen, gelappten Hülle steckt, die allerdings beim Herausziehen häufig im Boden stecken bleibt. Er wird in Laubwäldern, insbesondere unter Eichen und Rotbuchen sowie in Parkanlagen auf nährstoffreichen Böden gefunden.

Der Spitzhütige Knollenblätterpilz, *Amanita virosa*, hat einen weissen, oft spitzkegeligen Hut mit einem Durchmesser von 4 bis 10 cm, einen langen faserigen Stiel und eine sehr dünnhäutige, vergängliche Manschette. Er tritt ebenfalls in Laubwäldern besonders unter Rotbuchen, Eichen, Birken, aber auch unter Fichten auf.

Der Weiße Knollenblätterpilz, *Amanita verna*, ähnelt *A. phalloides*, ist aber mit einem Hutdurchmesser von 5 bis 8 cm kleiner als die oben genannten Pilze. Er ist unter Eichen zu finden, kommt aber selten vor. Die bis 2005 nur südlich der Mainlinie nachgewiesene Art scheint sich, wie ein 2005 in Sachsen beobachteter Vergiftungsfall zeigt, möglicherweise als Folge der Klimaerwärmung, nach Norden ausgebreitet zu haben.

Weitere, in Nordamerika heimische, durch Cyclopeptide giftige *Amanita*-Arten sind *Amanita ocreata*, *A. bisporigera*, *A. hygroskopica* und *A. suballiacea*. Die in China vorkommende Art *Amanita existialis* enthält ebenfalls toxikologisch bedeutsame Mengen von Cyclopeptiden.

Die Amatoxinkonzentrationen betragen bei *Amanita phalloides* (getrocknet) 0.25 bis 0.52 %, davon durchschnittlich 40 %  $\alpha$ -Amanitin, 50 %  $\beta$ -Amanitin und 10 %  $\gamma$ -Amanitin. Bezogen auf das Frischgewicht wurden zwischen 17 bis 37 mg Amanitine/100 g bestimmt. Toxinkonzentration und Toxinzusammensetzung variieren innerhalb der Fruchtkörper und in Abhängigkeit vom Standort. Bei *Amanita virosa* liegen die Amatoxinkonzentrationen zwischen 0.06 und 0.22 % und bei *A. verna* zwischen 0 und 0.57 %.

Die nachgewiesenen Phallotoxinkonzentrationen betragen bei *Amanita phalloides* 0.10 bis 0.52 %, bei *A. virosa* 0 bis 0.36 % und bei *A. verna* 0 bis 0.24 %. Bei den europäischen Herkünften überwiegen Phallacin und Phallisacin, für die Pilze nordamerikanischer Herkunft werden als Hauptkomponenten Phalloidin, Phallacidin, Phallisin und Phalloin angegeben.

Ebenfalls durch Amatoxine giftig sind *Galerina marginata*, Nadelholz-Häubling, und andere *Galerina*-Arten sowie verschiedene *Lepiota*-Arten, z.B. *Lepiota helveola*, Fleischrötlicher Schirmling, und *L. brunneoincarnata*, Fleischbräunlicher Schirmling.



*Galerina marginata*  
Nadelholz-Häubling



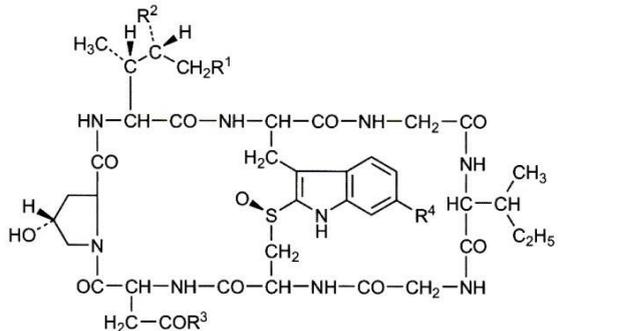
*Lepiota helveola*  
Fleischrötlicher Schirmling

**Abb. 2:** *Galerina marginata* und *Lepiota helveola* (Quelle: pilz-baden.ch, www.empolmicologica.it)

## 2.2. Chemie

Hauptgiftstoffe sind die Amatoxine (Abb. 3). Sie wurden erstmals 1941 von Heinrich Wieland und R. Hallermeyer isoliert. Das Toxingemisch konnte durch Theodor Wieland und Mitarbeiter in seine Komponenten zerlegt und die Strukturen der einzelnen Komponenten konnten aufgeklärt werden.

Amatoxine sind bicyklische Octapeptide mit einem aus 7 L-Aminosäuren und Glycin aufgebauten Ring, der durch eine von einem Cysteinrest ausgehende und zu einem meistens hydroxylierten Tryptophanrest führende (R)-Sulfoxid-Gruppierung überbrückt wird. Die 9 bisher bekannten Vertreter unterscheiden sich durch die Anzahl der Hydroxygruppen und durch Fehlen oder Vorhandensein des Amidstickstoffes am Asparaginsäurerest. Wesentlich für die Wirkung ist die Anwesenheit von  $\gamma$ -hydroxyliertem Isoleucin.

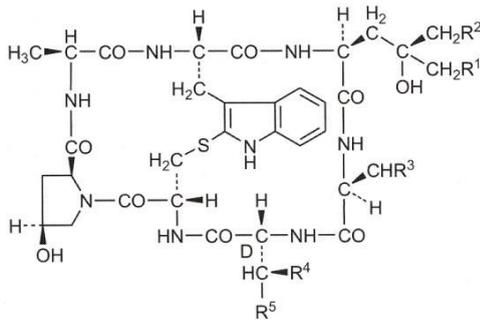


	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	LD <sub>50</sub> [mg/kg KG], (Maus, p.o.)
$\alpha$ -Amanitin	OH	OH	NH <sub>2</sub>	OH	0,4 - 0,8
$\beta$ -Amanitin	OH	OH	OH	OH	0,5 - 1,0
$\gamma$ -Amanitin	H	OH	NH <sub>2</sub>	OH	0,4
Amanin	OH	OH	OH	H	0,5
Amanullin	H	H	NH <sub>2</sub>	OH	~ 20

**Abb. 3:** Amatoxine

Amatoxine sind gut wasserlösliche, hitzeresistente Verbindungen, die auch im Magen-Darm-Trakt nicht zerstört werden. Sie lassen sich in Mengen ab 0,2 mg/ml im Pilzsaft nachweisen, indem man ligninhaltiges Papier (Zeitungspapier) zunächst mit dem Saft und nach dem Antrocknen mit konzentrierter Salzsäure befeuchtet. Eine nach etwa 15 min eintretende Blau-färbung deutet auf das Vorhandensein von Amatoxinen hin (Indolreaktion). Da der Test sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Ergebnisse liefert, zeigt er durch Amatoxine giftige Pilze nicht mit Sicherheit an. Für den forensischen Nachweis der Amatoxine stehen heute ELISA- und neuerdings auch HPLC-MS Methoden zur Verfügung.

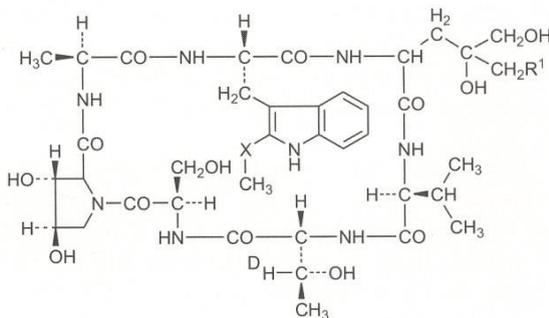
Phallotoxine (Abb. 4) wurden 1937 erstmals von R. Lynen und U. Wieland isoliert. Die Strukturaufklärung erfolgte durch Theodor Wieland und Mitarbeiter. Es sind bicyklische Heptapeptide. Auch hier übernimmt das S-Atom eines Cysteinrestes den Brückenschlag zum Tryptophan. Das S-Atom trägt allerdings, im Gegensatz zu dem der Amatoxine, keinen Sauerstoffrest. Die Phallotoxine kann man in 2 Gruppen einteilen: die neutralen Phallotoxine Phalloin, Phalloidin, Phallisin sowie Prophalloin und die sauren Phallotoxine Phallacin, Phallacidin sowie Phallisacin. Die Ersteren enthalten D-Threonin, die Letzteren an dessen Stelle D-ss-Hydroxyasparaginsäure.



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	LD <sub>50</sub> [mg/kg KG], (Maus, p.o.)
Phalloidin	OH	H	H <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	2
Phalloin	H	H	H <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	1,5
Phallisin	OH	OH	H <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	2
Phallisacin	OH	OH	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	COOH	4,5
Phallacidin	OH	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	COOH	1,5

Abb. 4: Phallotoxine

Die bisher nur bei *Amanita virosa* gefundenen Virotoxine (Abb. 5) sind im Gegensatz zu den Amatoxinen und Phallotoxinen monozyklische Peptide. Sie sind aus 7 Aminosäuren aufgebaut und enthalten einen chromophoren 2-Alkylsulfonyl-tryptophanrest und einen 3,4-Dihydroxy-prolinrest. Sie gehen vermutlich aus Phallotoxinen durch Aufspaltung der Thioetherbrücke hervor. Das im Gemisch dominierende Virotoxin ist Viroisin (etwa 50 % des Gemischs). Ob Virotoxine bei allen Provenienzen von *Amanita virosa* vorkommen und ob sie stets von Amatoxinen und Phallotoxinen begleitet werden, ist noch ungewiss.



	X	R <sup>1</sup>
Viroisin	SO <sub>2</sub>	OH
Desoxyviroisin	SO	OH
Viroidin	SO <sub>2</sub>	H

Abb. 5: Virotoxine

### 2.3. Pharmakologie

$\alpha$ -Amanitin hemmt schon in Konzentrationen von  $10^{-9}$  M hochspezifisch die RNA Polymerase II eukaryotischer Zellen und unterdrückt damit die Bildung der mRNA. Angriffspunkt des Toxins ist die Untereinheit SB 3 (140000 Dalton-Polypeptid) des Enzyms, die einen 1:1 Komplex mit dem Toxin bildet. Wahrscheinlich stabilisiert das Toxin einen ternären Komplex aus Template-DNA, Enzym und entstehender Ribonucleotidkette. Es hemmt die Elongation bei jedem Translokationsschritt. Durch Ausbleiben der

Proteinsynthese kommt es zum Zelltod. Zuerst werden die Organe mit intensiver Proteinsynthese, vorwiegend Leber und Niere, betroffen.

Die anderen Amatoxine haben den gleichen Wirkungsmechanismus. Für die biologische Aktivität sind das bityklische Ringsystem, die Sulfoxidbrücke, die hydroxylierte Isoleucinseitenkette und die OH- Gruppe des Hydroxyprolins erforderlich.

Die Amanitine werden schnell aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und nur in geringem Masse an Serumproteine gebunden.

In einer Studie von Langer et al. [5] konnten bei 70 % der Patienten nach 12 h und bei 40% nach 24 h Amatoxine im Blut nachgewiesen werden. Nach 48 h waren alle Resultate negativ. Eine Korrelation zum Schweregrad konnte nicht nachgewiesen werden. Die Ausscheidung erfolgt über die Galle (ca. 60%) und, da die Amatoxine glomerulär filtrierbar sind, über die Niere. In der erwähnten Studie waren nach 12-24 h 100 % der Urine positiv, nach 48 h etwa 80 %.

Die Aufnahme in humane Leberzellen wird über Transportmoleküle der Organische Anionen Transportierenden Polypeptid-Familie (OATP-Familie) vermittelt. Die in die Hepatozyten aufgenommene Menge ist proportional der Toxinkonzentration im Serum. Unmittelbar nach Erreichen der Leber beginnt die Exkretion in die Galle, sodass der enterohepatische Kreislauf bei Massnahmen zur Toxinelimination zu berücksichtigen ist. Der grösste Teil der Amatoxine wird über die Niere ausgeschieden, ein Teil auch im Stuhl. Ein Teil wird renal rückresorbiert. In einigen Fällen waren am 9. und am 22. Tag nach der Pilzvergiftung sowohl in der Leber als auch in der Niere noch beträchtliche Amanitinmengen nachweisbar.

Phallotoxine, besonders gut untersucht ist das Phalloidin, binden spezifisch an die polymere Form des Actins. Das führt zu einer Stabilisierung der F-Actinfilamente und zu einer Abnahme der Konzentration an monomerem Actin. Daraus ergeben sich u. a. Strukturveränderungen der actinhaltigen Zellmembranen und Endomembranen, gefolgt von übermässigem  $K^+$ -Verlust der Zelle, der Freisetzung abbauender Enzyme aus den Lysosomen und schliesslich der Zerstörung der Zellen.

Strukturelle Voraussetzungen für die biologische Aktivität der Phallotoxine sind das bityklische Ringsystem, die Methylseitenkette des 15-gliedrigen Rings, die allo-Hydroxygruppe von Prolin und die lipophile Indolythioethergruppe.

**Phallotoxine werden im Gegensatz zu den Amatoxinen nach peroraler Zufuhr nur schlecht resorbiert. Abgesehen von ihrer geringeren Toxizität spielen sie auch aus diesem Grunde bei Pilzvergiftungen keine Rolle.**

Für die spezifische Aufnahme der Phallotoxine in Hepatozyten sind auch bei den Phallotoxinen hepatische Transportproteine der OATP-Familie (s. o.), die physiologisch für den Transport von Gallensäuren zuständig sind, verantwortlich.

Obwohl die für die Phallotoxinwirkung erforderlichen Strukturvoraussetzungen bei den Virotoxinen nicht erfüllt sind, zeigen sie ähnliche biologische Aktivität. Sie bilden ebenfalls Komplexe mit polymerem Actin und verursachen bei Tieren innerhalb von 2 bis 5 Stunden den Tod durch Hämorrhagien der Leber.

Die  $LD_{50}$ -Werte für Amatoxine und Phallotoxine für die Maus sind in den Abbildungen 3 und 4 aufgeführt. Aufgrund von Unterschieden ihrer Resorption aus dem Darm, der Rückresorption aus dem Primärharn und der Aufnahme in den enterohepatischen Kreislauf sind die  $LD_{50}$ -Werte für die einzelnen Säugetierarten bei peroraler Applikation verschieden. Sie reichen von 0,1 mg/kg für  $\alpha$ -Amanitin beim Meerschweinchen bis zu 2,0 mg/kg bei der Ratte. Schweine und Kaninchen sollen Grüne Knollenblätterpilze ohne Schädigung verzehren können. Bei Mäusen ergibt sich eine  $LD_{50}$  für Viroisin von 1,68 mg, für Desoxyviroisin von 3,35 mg und für Viroidin von 1,0 mg/kg, i. p.

**Für den Menschen beträgt die letale Dosis (p.o.) der Amatoxine etwa 0.1 mg/kg [3].**

Das bedeutet, dass ein Exemplar von *Amanita phalloides* von 50 g die für einen Erwachsenen tödliche Menge an Amanitinen enthält. *Galerina marginata* enthält in etwa 100 bis 150 g Frischpilz die tödliche Amatoxinmenge, *Lepiota brunneoincarnata* ebenfalls in ca. 100 g.

Die letale Dosis der Amatoxine für den Menschen ist 10- bis 20-mal kleiner als die der Phallotoxine.

Amanitine, Phallotoxine und ihre halbsynthetischen Abwandlungsprodukte leisten aufgrund ihrer spezifischen Wirkungen nützliche Dienste in der experimentellen Zellforschung. So dient  $\alpha$ -Amanitin als Indikator für alle Prozesse, an denen RNA-Polymerase II beteiligt ist. Die Phallotoxine können zum Nachweis von Actin und actinabhängigen Reaktionen (z. B. alle Arten von Zellmotilität) herangezogen werden.

## **2.4. Vergiftungsfälle, Vergiftungssymptome und Behandlung von Vergiftungen**

### **2.4.1. Vergiftungsunfälle**

Vergiftungen durch den Grünen Knollenblätterpilz, *Amanita phalloides*, sind in Mitteleuropa, aber auch in aussereuropäischen Ländern, z. B. den USA und Australien, nicht selten. Der Pilz wird für über 90 % aller tödlichen Pilzvergiftungen verantwortlich gemacht. In 205 ausgewerteten Fällen der Jahre 1971 bis 1980 fand Flörsheim bei Kindern unter 10 Jahren eine Letalitätssrate von 51,3 %, bei Kindern über 10 Jahren und Erwachsenen von 16,5 %. In neueren Arbeiten wird die Letalität mit 20 bis 40% angegeben.

Vergiftungen mit Knollenblätterpilzen können auftreten bei Verwechslung der Pilze mit Champignons, Grünlingen oder Grünen Täublingen, Unkenntnis der Giftigkeit der Pilze oder absichtlichem Verzehr in suizidaler Absicht. Oftmals sind ganze Gruppen oder Familien betroffen.

Fallbeispiel aus Lit. 3: Der Vater einer Familie fand im August in einem Eichenbestand ansehnliche grüne Pilze mit weissen Blättern, Manschette und Stielknolle. Er hielt sie für Grüne Täublinge und schnitt die Fruchtkörper dicht über dem Erdboden ab. Vater, Mutter, Tochter, Sohn und ein Gast der Familie assen von dem Gericht, das fast nur aus Grünen Knollenblätterpilzen bestand, zu Mittag. In der Nacht (etwa 10 h später) setzten bei allen Personen andauerndes Erbrechen und Durchfall ein. Am nächsten Morgen erfolgte die Krankenhaus-einweisung. Der erste Essenteilnehmer starb 2 Tage nach dem Verzehr, die anderen bis zu 7 Tagen nach dem Essen.

Die Pilze behalten auch nach mehrmonatiger Lagerung im Gefrierschrank ihre Toxizität.

Vergiftungen durch den Spitzhütigen Knollenblätterpilz, *Amanita virosa*, und den Weissen Knollenblätterpilz, *A. verna*, treten besonders in nichteuropäischen Ländern auf, u. a. in den USA, Korea, Mexiko und Israel. In Deutschland ereignete sich im Sommer 2005 eine schwere Vergiftung einer dreiköpfigen Familie durch Verwechslung des Weissen Knollenblätterpilzes, *Amanita verna*, mit Champignons.

Über schwere Vergiftungen durch *Galerina*-Arten wird ebenfalls berichtet. Verwechslungsgefahr besteht mit *Kuehneromyces mutabilis*, dem Gemeinen Stockschwämmchen, oder dem Hallimasch, *Armillaria mellea*.

Kleine Lepiota-Arten können u.a. mit dem Nelken-Schwindling, *Marasmius oreades*, verwechselt werden. Berichte über Vergiftungen durch Lepiota-Arten, teilweise mit tödlichem Ausgang, liegen besonders aus dem Mittelmeerraum vor.

#### 2.4.2. Vergiftungssymptome

Vergiftungen durch Grüne Knollenblätterpilze, *Amanita phalloides*, Spitzhütige Knollenblätterpilze, *A. virosa*, Weiße Knollenblätterpilze, *A. verna*, und andere Amanitine enthaltende Pilze sind durch die lange Latenzzeit von 6 bis 24 Stunden, selten bis 48 Stunden, vor Auftreten der ersten Symptome charakterisiert.

**Bei Auftreten einer akuten Gastroenteritis nach einer Pilzmahlzeit mit Verzögerung von 6 Stunden oder mehr ist immer von einer Vergiftung durch Knollenblätterpilze auszugehen und, ohne eine weitere Diagnosesicherung abzuwarten (!), eine Therapie zu beginnen.**

In der einsetzenden ersten Vergiftungsphase kommt es zu Erbrechen, blutig-wässrigen, choleraähnlichen Durchfällen und Koliken. In dieser Phase kann bereits der Tod eintreten. Sie ist aber durch Flüssigkeits- und Elektrolytzufuhr meist noch gut beherrschbar. In leichten Fällen ist die Vergiftung damit in wenigen Tagen überstanden. In den anderen Fällen kommt es zu einer vorübergehenden Remission mit relativem Wohlbefinden des Patienten, der nach 2 bis 5 Tagen die dritte Vergiftungsphase mit den Symptomen einer schweren Leber- und meistens auch Nierenschädigung folgt. Dazu gehören extreme Erhöhung der Transaminase- und anderer Enzymwerte im Serum, starke Abnahme des Prothrombin-Wertes (ein Quickwert kleiner 20 % ist prognostisch sehr ungünstig), Leberschwellung und Ikterus. Anzeichen der Nierenschädigung sind das Auftreten von Proteinen und Erythrozyten im Urin und schliesslich Nierenversagen. Sekundäreffekte betreffen Herz, ZNS und weitere Organe. Der Tod tritt 2 bis 5 Tage nach Verzehr der Pilze im Coma hepaticum oder durch Kreislaufversagen ein. Die Sektion zeigt fettige Degeneration und Nekrose von Leber, Nieren, Nebennieren, Herz- und Skelettmuskeln.

Vergiftungen mit *Amanita phalloides* während der Schwangerschaft können zu intrauteriner Wachstumsretardation der Kinder führen, bewirken aber nicht zwangsläufig Anomalien der Kinder.

#### 2.4.3. Behandlung von Vergiftungen

Vergiftete Personen und auch solche, bei denen Verdacht auf Vergiftung besteht, sind so schnell wie möglich einer intensiven ärztlichen Behandlung zuzuführen. Da die Schwere der Vergiftung entscheidend von der Menge und Einwirkungszeit der Toxine in der Leber abhängig ist, müssen sofort intensive Massnahmen zur Verhinderung einer weiteren Giftaufnahme in die Leber getroffen werden. Magenspülung ist nur vor Auftreten gastrointestinaler Symptome sinnvoll. Gabe von Laxanzien sowie Verabreichung von Aktivkohle, alle 4 bis 6 Stunden ca. 50 g über eine Magensonde, kann den enterohepatischen Kreislauf der Pilzgifte unterbrechen. Eine wichtige Massnahme zur sekundären Giftelimination ist die Plasmapherese (extrakorporale Entgiftung mit Hilfe von MARS - Molecular Adsorbent Recirculating System). Sie kann die Letalität auf unter 10 % senken.

Bei bereits aufgetretener gastrointestinaler Symptomatik muss für Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution unter zentraler Venendruckkontrolle gesorgt werden. Spezifische Massnahmen sind die i. v. Applikation von Silibinin (5 mg/kg in der 1. Stunde, danach 20 mg/kg pro Tag als Dauerinfusion) oder von Penicillin G (1 Mio I.E./kg pro Tag) bis zum Abfall der Transaminasewerte. Silibinin, ein Flavolignangemisch aus der Mariendistel, *Silybum marianum*, blockiert durch kompetitive Rezeptorbindung, wie auch Penicillin G, die Giftaufnahme in die Leberzellen und soll die Regenerationsfähigkeit der Leber fördern. Der Nutzen einer Gabe von Acetylcystein kann noch nicht endgültig eingeschätzt werden.

Bei Auftreten schwerster Symptome, z. B. bei massivem Transaminaseanstieg im Blut, bei Quickwerten kleiner 20 % und Nierenfunktionsstörungen ohne Besserungstendenz am 4. Tag, kann nur eine Lebertransplantation lebensrettend sein.  
Bei Überstehen der Vergiftung muss noch lange Zeit Diät eingehalten werden.

### 3. Quantitative Erfassung von $\alpha$ -Amanitin (Methodik)

Die Notfallbestimmung der Amanitine kann mittels eines ELISA erfolgen (Bühlmann Laboratories AG, Postfach, CH-4123 Allschwil). Innerhalb 2 Stunden können aussagekräftige Resultate ermittelt werden.

Nachweisgrenze: 1,5 ng/ml, Messbereich: 1-100 ng/ml, Cutoff im Urin 5 ng/ml

LC-MS: Möglich ist der spezifische Nachweis der Amanitine in verschiedenen Körperflüssigkeiten mittels LC-MS. Analysenresultate sind frühestens nach 24 Stunden zu erwarten.

**Die vorliegende Arbeit befasst sich vorwiegend mit der quantitativen LC-MS-Bestimmung von  $\alpha$ -Amanitin in Körperflüssigkeiten und Pilzen.  $\alpha$ -Amanitin gilt als Leitsubstanz bei den beschriebenen Vergiftungen.**

Im Vergiftungsfall durch Pilze sind zudem folgende Notfalluntersuchungen angezeigt:

- Makroskopische Pilzbestimmung durch einen Mykologen in Mahlzeitresten und Rüstabfällen.
- Mikroskopische Sporenidentifikation im Mageninhalt und im Stuhl.
- Lignin-Test (Meixner-Test) zum Nachweis von Amanitin: Pilz oder Pilzreste auf den unbedruckten Teil einer einfachen Tageszeitung drücken. Stelle mit Bleistift markieren und trocknen lassen. Anschließend mit wenigen Tropfen 10-20 %iger Salzsäure beträufeln. In Gegenwart von Amatoxin zeigt sich nach einigen Minuten eine Blauviolettfröbung. Die Nachweisgrenze beträgt ca. 20  $\mu$ g/ml. (Quelle: Giftinfo Mainz). Der Test ist nicht sicher, er kann sowohl falsch-positive wie auch falsch-negative Resultate anzeigen.

Eine möglichst frühzeitige Kontrolle der Leberenzyme (Transaminasen), des Bilirubins, der Gerinnungsfaktoren (Quick-Wert) und der Nierenfunktion ist angezeigt.

## 4. Experimenteller Teil – LC-MS-Messungen [6,7,8,9]

### 4.1. Referenzmaterialien & Kalibrierlösungen

$\alpha$ -Amanitin,  $\beta$ -Amanitin und Phalloidin konnte in einer Menge von jeweils 1.0 mg erworben werden. Lieferant war die Firma SIGMA-ALDRICH (Schweiz). Die Datenblätter von SIGMA-ALDRICH für die einzelnen Toxine sind im Anhang 2 zu finden.

$\alpha$ -Amanitin und  $\beta$ -Amanitin sind in Wasser, neutralen Pufferlösungen (pH 6 - 8), Ethanol, Methanol, DMSO oder Dimethylformamid löslich.

Kalibrierlösungen: Die Gebinde von SIGMA ALDRICH werden vorsichtig geöffnet und mit 10.0 ml HPLC-Wasser versetzt. Es entsteht eine wäss. Stammlösung mit einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml. Weitere Kalibrierlösungen werden durch Verdünnung der Stammlösung mit HPLC-Wasser hergestellt. Bei Lagerung im Kühlschrank bei +4°C beträgt die Stabilität wässriger Lösungen 6-12 Monate, die von alkoholischen Lösungen bis zu 2 Jahre. Die Stammlösung wird in Aliquoten von 1 ml bei -20° C gelagert.

## 4.2. Instrumente und HPLC-MS-Bedingungen

HPLC-Bedingungen wurden im Wesentlichen aus Lit. 6 entnommen und wo nötig angepasst. Die Einstellungen des MSQ-Detektors wurden empirisch ermittelt.

HPLC: UHPLC UltiMate 3000 Thermo Scientific  
 DAD: 302 nm (Signal 1)  
 MS: MSQ-Plus Thermo Scientific, ESI Modus  
 (Diese MS-Einstellungen gelten für  $\alpha$ -Amanitin,  $\beta$ -Amanitin und Phalloidin)

- ESI Polarität: positiv
- Proben temperatur: 400 °C
- Spannung Nadel: 3000 V
- Spannung Detektor: 1024 V
- Spannung Konus: 75 V

Für die Quantifizierung wurden folgende Kanäle (SIM) aufgezeichnet:

$\alpha$ -Amanitin : [M+H]<sup>+</sup> , m/z = 919.3, Span = 1.0  
 $\beta$ -Amanitin : [M+H]<sup>+</sup> , m/z = 920.3, Span = 1.0  
 Phalloidin : [M+H]<sup>+</sup> , m/z = 789.3, Span = 1.0

Säule: Accucore 150 x 2.1 mm, 4  $\mu$ m, Thermo Scientific  
 Vorsäule: Accucore 10 x 2.1 mm, 2.6  $\mu$ m, Thermo Scientific  
 Eluent: B: H<sub>2</sub>O, 0.1% Ameisensäure  
 D: Acetonitril, 0.1% Ameisensäure

Gradient	Zeit [min]	B [%]	D [%]
( $\alpha$ , $\beta$ -Amanitin)	0	97	3
	2	97	3
	20	87 (*)	13 (*)
	21	0	100
	25	0	100
	25.5	97	3
	30	97	3

(\*) für Phalloidin: 20% B und 80% D

Flow: 0.3 ml/min  
 V Probe: 10  $\mu$ l (Injektionsvolumen)

### 4.3. Messungen mit Reinsubstanzen ( $\alpha,\beta$ -Amanitin und Phalloidin)

#### 4.3.1. Spektren, Linearität und Nachweisgrenze (LOD)

Gemessen wurden die reinen, wässrigen Kalibrierlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen.

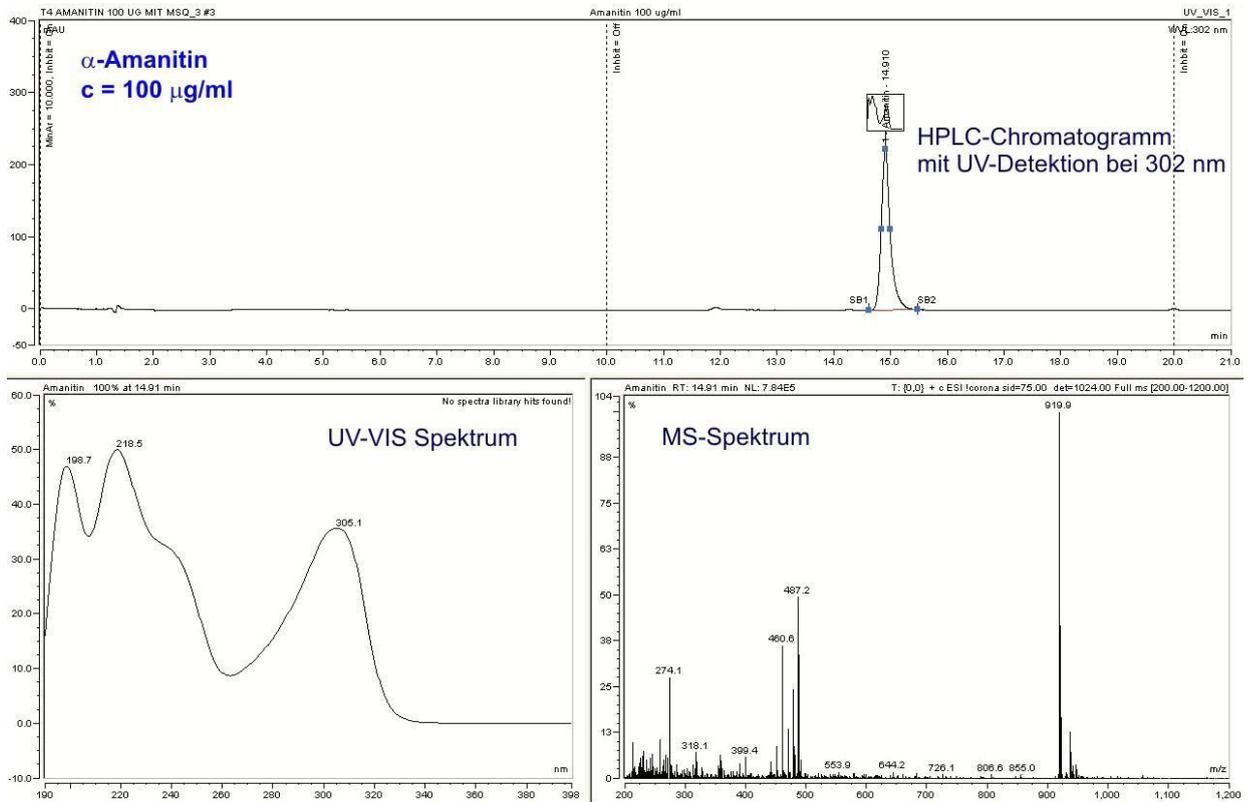
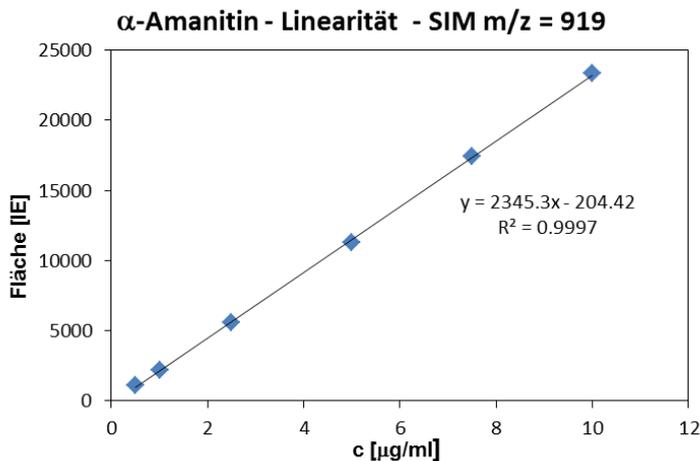


Abb. 6: Chromatogramm und Spektren von  $\alpha$ -Amanitin



Die LOD von  $\alpha$ -Amanitin wurde mit einem S/N-Verhältnis von min. 3:1 bestimmt. Verwendet wurden reine Kalibrierlösungen.

**Bestimmte LOD für folgende Kanäle:**

**SIM (m/z = 919.3) = 50 ng/ml**

**UV (302 nm) = 1000 ng/ml**

Abb. 7: Linearität von  $\alpha$ -Amanitin (SIM m/z = 919.3)

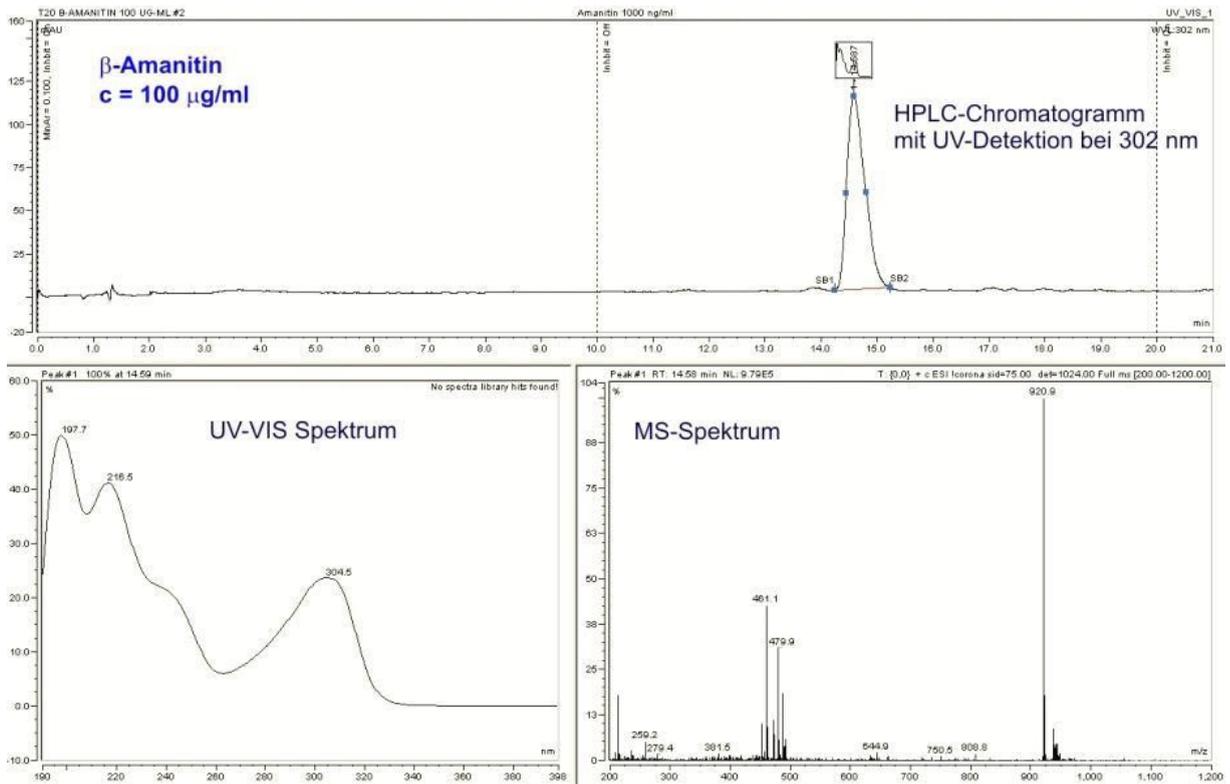
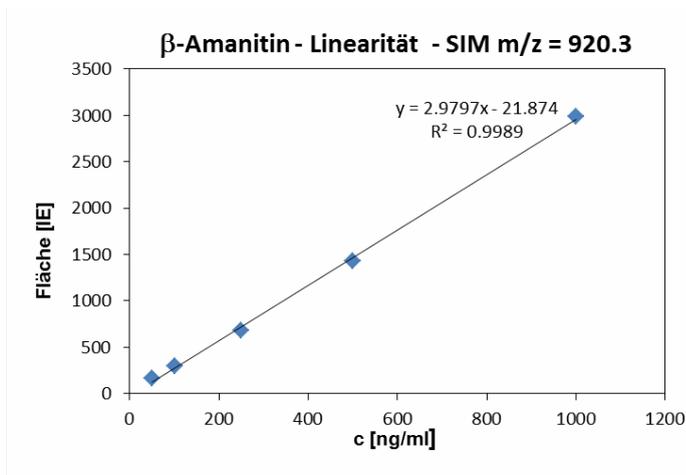


Abb. 8: Chromatogramm und Spektren von  $\beta$ -Amanitin



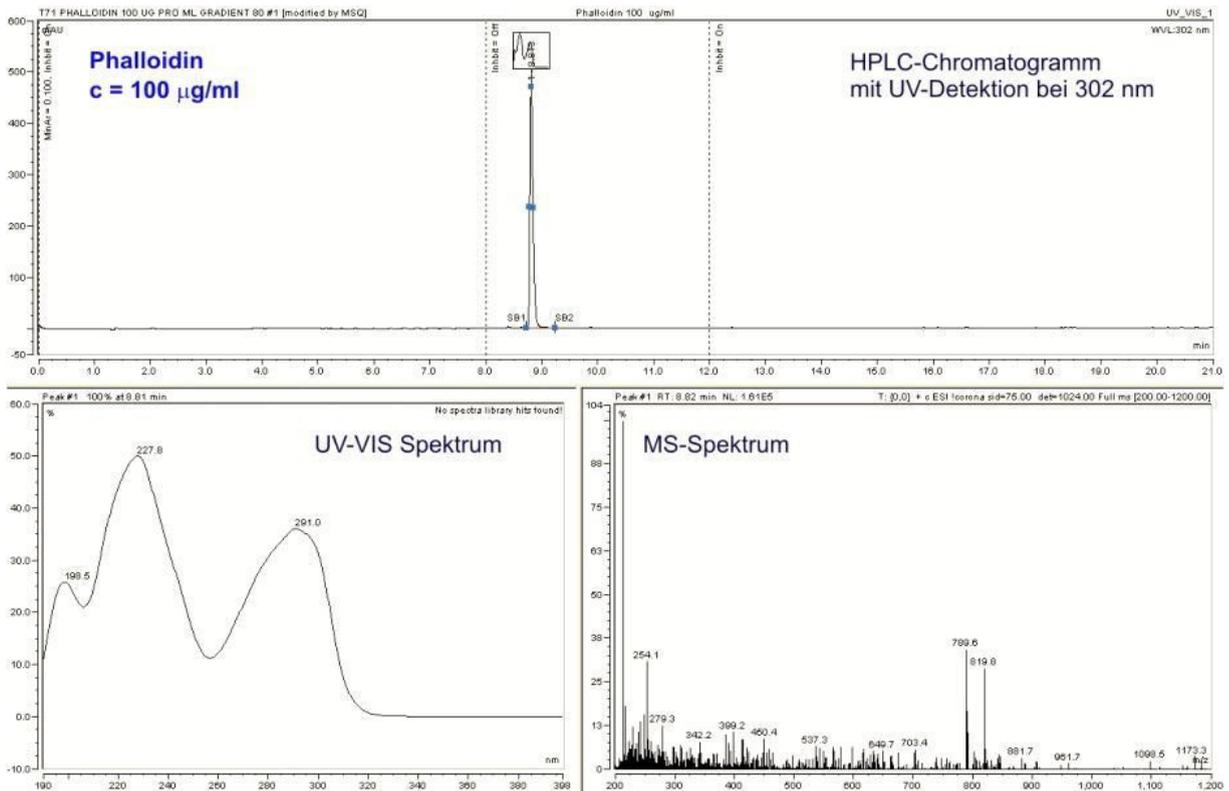
Die LOD von  $\beta$ -Amanitin wurde mit einem S/N-Verhältnis von min. 3:1 bestimmt. Verwendet wurden reine Kalibrierlösungen.

**Bestimmte LOD für folgende Kanäle:**

**SIM ( $m/z = 920.3$ ) = 50 ng/ml**

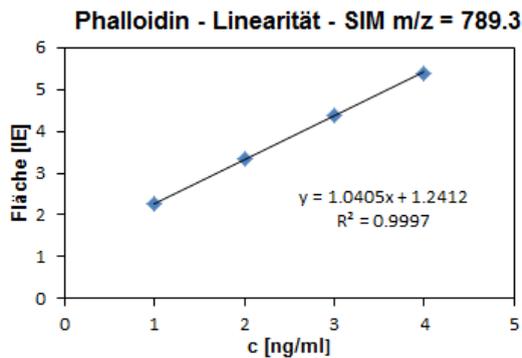
**UV (302 nm) ca. 2500 ng/ml**

Abb. 9: Linearität von  $\beta$ -Amanitin (SIM  $m/z = 920.3$ )



**Abb. 10:** Chromatogramm und Spektren von Phalloidin

Für die Messungen mit Phalloidin wurden 4 Kalibrierlösungen mit den Konzentrationen 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml und 10'000 ng/ml verwendet. Entsprechend dem grossen Konzentrationsbereich wird Signal- und Konzentrations-Achse im logarithmischen Masstab dargestellt.



Die LOD von Phalloidin wurde mit einem S/N-Verhältnis von min. 3:1 bestimmt. Verwendet wurden reine Kalibrierlösungen.

**Bestimmte LOD für folgende Kanäle:**

**SIM (m/z = 789.3) = 5 ng/ml**

**UV (302 nm) ca. 1000 ng/ml**

**Abb. 11:** Linearität von Phalloidin (SIM m/z = 789.3). Es wurden die logarithmierten Werte verwendet.

#### 4.4. Messung von $\alpha$ -Amanitin in Pilzen und Pilzgerichten

##### 4.4.1. $\alpha$ -Amanitin gespikt in Zucht-Chapignons und in einem gekauften Pilzgericht

###### Extraktion

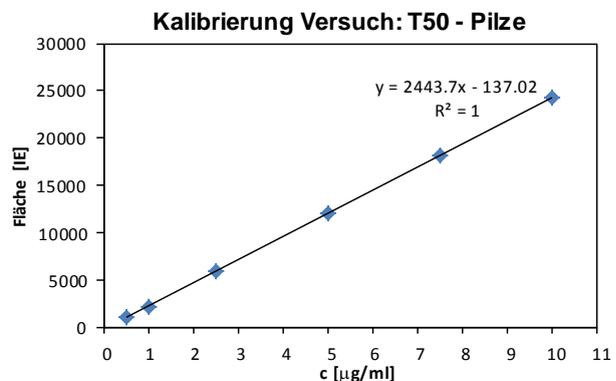
Ca. 50 g der Champignons bzw. der Mischpilze werden im Mixer zerkleinert. 10.0 g der zerkleinerten Pilze werden im Ultraschallbad (15 min, 40 °C) mit 50 ml Ameisensäure 0.1% extrahiert. Der Überstand wird in einen 100 ml Messkolben filtriert. Der Rückstand wird zweimal mit 20 ml Ameisensäure 0.1% nachextrahiert (Ultraschallbad, 10 min, 40°C). Die vereinigten Filtrate im Messkolben werden mit Ameisensäure 0.1% zu 100.0 ml ergänzt (Stammlösung). 1.0 ml der Stammlösung wird mit Ameisensäure 0.1% zu 100.0 ml verdünnt. Diese Lösung wird zentrifugiert (3000 g, 10 min). 980  $\mu$ l der zentrifugierten Lösung werden mit 20  $\mu$ l  $\alpha$ -Amanitin-Lösung (c = 100  $\mu$ g/ml) gespikt und für die Analyse verwendet. Die Sollkonzentration in der Messlösung beträgt somit 2.0  $\mu$ g/ml.



Abb. 12: Mischpilze

Kalibrierung (jeweils 3 Messungen) SIM m/z= 919.3

Probe Nr.	c Kalib. [ $\mu$ g/ml]	Fläche [IE]	Rt [min]
1	10	24240	14.983
2	7.5	18252	15.017
3	5	12113	15.017
4	2.5	6000	15.017
5	1	2208	14.999
6	0.5	1124	15.011



Proben

Probe Nr.	Proben	Fläche [IE]	Rt [min]	c $\mu$ g/ml Messlösung	Abweichung [%]
13	Misch 1	5063	15.022	2.128	6.4
14	Misch 2	5111	14.988	2.148	7.4
15	Misch 3	4938	15.039	2.077	3.8
16	Champignon	5092	14.971	2.140	7.0
17	Champignon	5042	14.963	2.119	6.0
18	Champignon	5051	14.955	2.123	6.2

Abweichung vom Sollwert in [%]	Mischpilze	+ 5.8
	Champignon	+ 6.4

Abb. 13: Resultate  $\alpha$ -Amanitin in Mischpilzen und Zuchtchampignons

In den nicht gespikten Messlösungen (Blanks) wurde erwartungsgemäss kein Signal (UV und MS) gefunden.

**4.4.2.  $\alpha$ -Amanitin in *Amanita Phalloides* (Grüner Knollenblätterpilz)**

Von der Pilzkontrollstelle Thun (amtl. Pilzkontrolleur, Herr Heger) wurden 3 grüne Knollenblätterpilze (im gefrorenen Zustand) zur Verfügung gestellt.



**Abb. 14:** *Amanita phalloides*

**Extraktion von  $\alpha$ -Amanitin:**

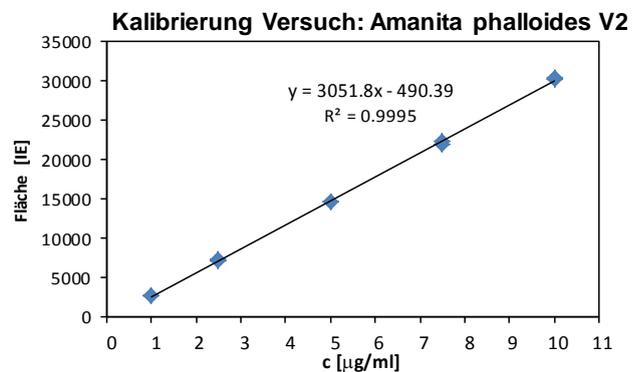
Ein ganzer Pilz (Hut und Stiel) wurde aufgetaut und anschliessend im Mixer zerkleinert. 10.0 g des zerkleinerten Pilzes werden im Ultraschallbad (15 min, 40 °C) mit 50 ml Ameisensäure 0.1% extrahiert. Der Überstand wird in einen 100 ml Messkolben filtriert. Der Rückstand wird zweimal mit 20 ml Ameisensäure 0.1% nachextrahiert (Ultraschallbad, 10 min, 40°C).

Die vereinigten Filtrate im Messkolben werden mit Ameisensäure 0.1% zu 100.0 ml ergänzt (Stammlösung). Messlösungen mit verschiedener Konzentration werden durch verdünnen (1:10, 1:20 und 1:50) der Stammlösung mit Ameisensäure 0.1% hergestellt. Die Messlösungen werden zentrifugiert (3000 g, 10 min) und ohne weitere Aufarbeitung für die LC-MS Analyse verwendet.

**Versuch: *Amanita phalloides* V2**

10.0 g Pilz in 100 ml HCOOH 0.1% = Stammlösung (S)  
 Verdünnungen: 1:10, 1:20 und 1:50 = Messlösungen (M)  
 Jede Probe wurde 2x gemessen  
 Gemessen wurde der SIM-Kanal [M+H]<sup>+</sup>, m/z =919.3

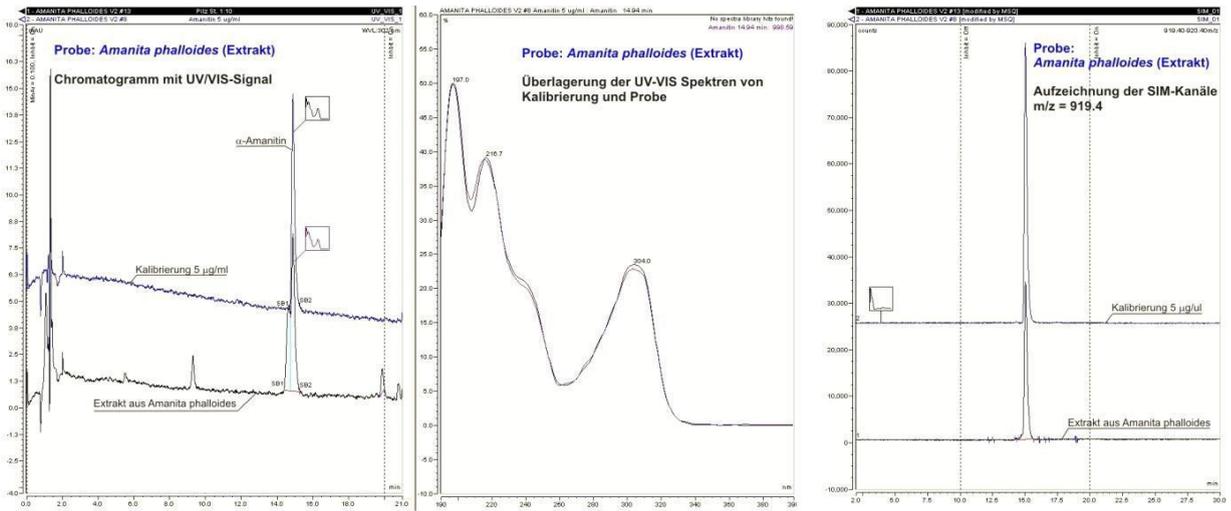
Probe Nr.	c Kalib. [ $\mu$ g/ml]	Fläche [IE]	Rt [min]
2	1	2641	15.005
3	1	2762	15.023
4	2.5	7244	15.039
5	2.5	7130	15.023
6	5	14545	15.023
7	5	14586	15.023
8	7.5	22344	15.039
9	7.5	21969	15.005
10	10	30261	15.039
11	10	30308	15.039



Probe Nr.	Proben	Fläche [IE]	Rt [min]	c [%] im Pilz
13	M 1:10	8594	15.039	<b>0.030</b>
14	M 1:10	8867	15.023	<b>0.031</b>
15	M 1:20	4278	15.039	<b>0.031</b>
16	M 1:20	4199	15.023	<b>0.031</b>
17	M 1:50	1503	15.023	<b>0.033</b>
18	M 1:50	1492	15.039	<b>0.032</b>

**$\alpha$ -Amanitin im Pilz (Mittelwert) = 0.031%**

**Abb. 15:**  $\alpha$ -Amanitin in *Amanita Phalloides* (Grüner Knollenblätterpilz)



**Abb. 16:** Chromatogramme, UV-VIS-Spektren und SIM Kanäle ( $m/z = 919.4$ ) von Kalibrierung und Probe (Extrakt aus *Amanita phalloides*).

#### 4.4.3. $\alpha$ -Amanitin im Urin

Bei einer Knollenblätterpilzvergiftung erfolgt die Ausscheidung über Galle (ca. 60%) und, da die Amatoxine glomerulär filtrierbar sind, über die Niere. In einer Studie von Langer et al. [5] waren nach 12-24 h 100% der Urine positiv, nach 48 h etwa 80%. Neben der Quelle der Vergiftung (Pilze, Essensreste) bietet sich im Vergiftungsfall also Urin als Probenmatrix an.

Da keine Echtprobe vorhanden war, wurde Urin von AW folgendermassen mit  $\alpha$ -Amanitin gespickt:

- Urin mit 50 ng/ml  $\alpha$ -Amanitin: 9950  $\mu$ l Urin + 50  $\mu$ l  $\alpha$ -Amanitin c = 10  $\mu$ g/ml
- Urin mit 20 ng/ml  $\alpha$ -Amanitin: 9980  $\mu$ l Urin + 20  $\mu$ l  $\alpha$ -Amanitin c = 10  $\mu$ g/ml

#### Aufarbeitung

3 ml Wasser und 1 ml 1 M Na-Phosphatpuffer (pH 5.5) werden mit 1.0 ml Probe (Urin) gemischt. Die Mischung wird auf eine vorkonditionierte (5ml Methanol, 5 ml Wasser) C18 Säule (Supelco Discovery, DSC-18, 500 mg, 3 ml) geladen. Die C18-Säule wird mit 5 ml Wasser gewaschen.  $\alpha$ -Amanitin wird mit 3 ml Methanol eluiert. Das Eluat wird im 10 ml Rundkolben am Mini-Rotavapor vorsichtig zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 100  $\mu$ l Ameisensäure 0.1 % gelöst (Messlösung). 10  $\mu$ l dieser Lösung werden für die LC-MS-Analyse verwendet.

Durch dieses Verfahren wird eine Erhöhung der Konzentration von  $\alpha$ -Amanitin in der Probe um den Faktor 10 erreicht.

#### Kalibrierung und Berechnung

Die Messlösungen werden direkt mit der entsprechenden Kalibrierlösung verglichen. Als Blank wird der ungespickte Urin verwendet. Es wird eine Wiederfindung bestimmt.

#### Bemerkung:

Kalibrierlösungen von  $\alpha$ -Amanitin in Methanol ergeben im Vergleich zu wäss. Kalibrierlösungen gleicher Konzentration ein wesentlich kleineres SIM-Signal, obwohl die entsprechenden Massenspektren identisch sind. Das Phänomen konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Organische Analytik nicht geklärt werden.

## LS 2014-11

### Versuch: T47 (Urin 50 ng/ml)

Urin wurde mit 50 ng/ml  $\alpha$ -Amanitin gespikt und über SPE aufgearbeitet (4 wäss. Proben U1, U2, U3, U4)

Sollkonzentration in der Messlösung = 500 ng/ml

Vergleich: Kalibrierlösung  $\alpha$ -Amanitin mit 500 ng/ml

Gemessen wurde der SIM-Kanal [M+H]<sup>+</sup>, m/z =919.3

Probe Nr.	Probe	Fläche [IE]	Rt [min]
2	Kalib	1420.0	14.733
3	U1	1297.8	14.904
4	Kalib	1385.8	14.866
5	U2	1180.5	14.904
6	Kalib	1451.5	14.920
7	U3	1288.8	14.920
8	Kalib	1422.4	14.904
9	U4	1229.9	14.920
10	Blank Kalib	0.0	-
11	(MeOH) Kalib	474.2	14.546
12	U1	1464.2	14.920
13	Kalib	1291.8	14.938
14	U2	1427.0	14.938
15	Kalib	1145.9	14.904
16	U3	1432.2	14.904
17	Kalib	1274.9	14.920
18	U4	1411.7	14.904
19	Blank Kalib	1306.1	14.920
20	(MeOH) Kalib	0.0	-
21	U1	497.7	14.580
22	Kalib	1450.3	14.904
23	U2	1328.2	14.904
24	Kalib	1421.8	14.886
25	U3	1268.6	14.920
26	Kalib	1244.7	14.886
27	U4	1060.9	14.904
28	Blank	1180.2	14.950
29	Kalib (MeOH)	1073.3	14.920
30		0.0	14.529
31		460.9	14.529

#### Mittelwert Kalibrierung [IE1286]

Mittelwert U1 1305.9  
Mittelwert U2 1198.3  
Mittelwert U3 1208.2  
Mittelwert U4 1203.1

Mittelwert U1-U4 [IE]: 1229

Wiederfindung U1-U4 [%] 95.5

### Versuch: T40 (Urin 50 ng/ml)

Urin wurde mit 50 ng/ml  $\alpha$ -Amanitin gespikt und über SPE aufgearbeitet (Doppelprobe U1, U2) Sollkonzentration

in der Messlösung = 500 ng/ml Vergleich:

Kalibrierlösung  $\alpha$ -Amanitin mit 500 ng/ml Gemessen wurde der SIM-Kanal [M+H]<sup>+</sup>, m/z =919.3

Probe Nr.	Probe	Fläche [IE]	Rt [min]
3	Kalib	1258	14.866
4	Kalib	1257	14.920
5	U1	1169	14.920
6	U1	1155	14.954
7	U1	1134	14.971
8	Kalib	1162	14.989
9	Kalib	1317	14.989
10	Kalib	1349	14.954
11	U2	1241	14.989
12	U2	1274	14.971
13	U2	1301	14.954
14	Blank	0	-

Mittelwert Kalibrierung [IE] 1269

Mittelwert U1 1153.0  
Mittelwert U2 1272.0

Mittelwert U1-U2 [IE]: 1212

Wiederfindung U1-U2 [%] 95.5

**Versuch: T44 Urin 20 ng/ml**

Urin wurde mit 20 ng/ml  $\alpha$ -Amanitin gespikt und über SPE aufgearbeitet (4 Proben U1, U2, U3, U4)  
 Sollkonzentration in der Messlösung = 200 ng/ml  
 Vergleich: Kalibrierlösung  $\alpha$ -Amanitin mit 200 ng/ml  
 Gemessen wurde der SIM-Kanal [M+H]<sup>+</sup>, m/z = 919.3

Probe Nr.	Probe	Fläche [IE]	Rt [min]		
2	Kalib	517.4	14.920		
3	U1	447.7	14.920		
4	Kalib	522.5	14.904		
5	U2	450.9	14.886		
6	Kalib	521.6	14.920		
7	U3	470.2	14.920		
8	Kalib	522.1	14.904		
9	U4	448.9	14.869		
10	Kalib	520.7	14.904		
11	U1	455.4	14.904		
12	U2	490.2	14.920	Mittelwert Kalib. [IE]:	522
13	U3	463.5	14.869		
14	U4	466.9	14.869	Mittelwert U1 [IE]:	457
15	Kalib	532.8	14.869	Mittelwert U2 [IE]:	464
16	U1	469.0	14.866	Mittelwert U3 [IE]:	464
17	U2	450.6	14.904	Mittelwert U4 [IE]:	460
18	U3	457.2	14.904		
19	U4	462.7	14.904	Mittelwert U1-U4 [IE]:	461
20	Kalib	520.3	14.869		
21	Blank	0.0	-	Wiederfindung U1-U4 [%]	88.3

Abb. 17: Resultate  $\alpha$ -Amanitin im Urin

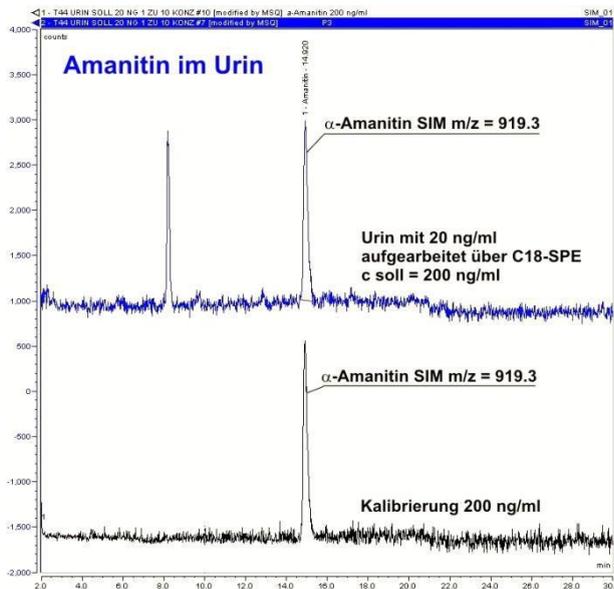


Abb. 18: Amanitin im Urin – Aufzeichnung des SIM-Kanals m/z = 919.3

**4.4.4.  $\alpha$ -Amanitin im Serum**

In einer Studie von Langer et al. [5] konnten bei 70 % der Patienten nach 12 h und bei 40 % nach 24 h Amatoxine im Blut nachgewiesen werden. Nach 48 h waren alle Resultate negativ. Eine Korrelation zum Schweregrad konnte nicht nachgewiesen werden. Die gefundenen Konzentrationen im Plasma bei Vergiftungsfällen betragen nach Lit. [6] 8-190 ng/ml.

## LS 2014-11

Da keine Echtprobe vorhanden war, wurde Plasma von einer Blutprobe von einer Mitarbeiterin (Corinne Öchslin) folgendermassen mit  $\alpha$ -Amanitin gespikt:

Plasma mit 20 ng/ml  $\alpha$ -Amanitin: 980  $\mu$ l Plasma + 20  $\mu$ l  $\alpha$ -Amanitin c = 1000 ng/ml

**Aufarbeitung:** Analog Urin, siehe 4.3.3

### Kalibrierung und Berechnung

Die Messlösungen werden direkt mit der entsprechenden Kalibrierlösung verglichen. Als Blank wird das nicht gespikte Serum verwendet. Es wird eine Wiederfindung bestimmt.

#### Versuch: T45 (Serum 20 ng/ml)

Serum wurde mit 20 ng/ml  $\alpha$ -Amanitin gespikt und über SPE aufgearbeitet (4 wäss. Proben S1, S2, S3, S4)

Sollkonzentration in der Messlösung = 200 ng/ml

Vergleich: Kalibrierlösung  $\alpha$ -Amanitin mit 200 ng/ml

Gemessen wurde der SIM-Kanal [M+H]<sup>+</sup>, m/z = 919.3

Probe Nr.	Probe	Fläche [IE]	Rt [min]
10	Kalib	446.6	14.886
11	Blank	0.0	-
12	S1	398.1	14.920
13	S2	400.8	14.869
14	S3	390.9	14.920
15	S4	382.7	14.920
16	Kalib	430.4	14.920
17	Blank	0.0	-
18	S1	412.4	14.954
19	S2	419.1	14.920
20	S3	427.7	14.904
21	S4	413.0	14.920
22	Kalib	448.2	14.920
23	Blank	0.0	-
24	S1	442.1	14.904
25	S2	451.5	14.904
26	S3	463.5	14.904
27	S4	465.8	14.920
28	Kalib	497.8	14.920

#### Mittelwert Kalibrierung [IE 456]

Mittelwert S1 417.5  
Mittelwert S2 423.8  
Mittelwert S3 427.4  
Mittelwert S4 420.5

Mittelwert S1-S4 [IE]: 422

Wiederfindung U1-U4 [%] 92.6

Abb. 19: Resultate  $\alpha$ -Amanitin im Serum

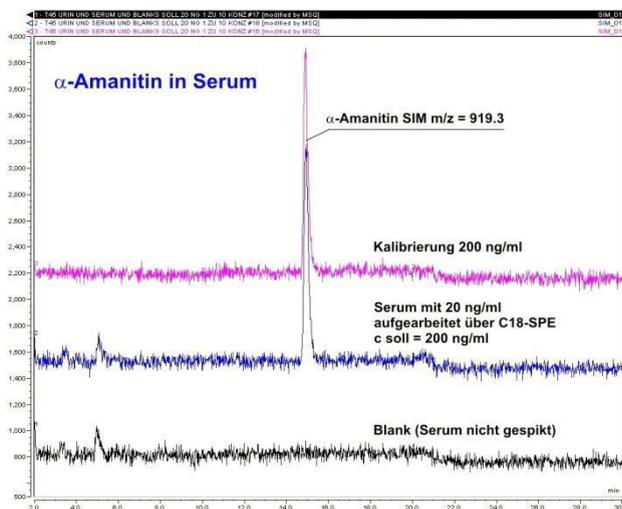


Abb. 19: Amanitin im Serum – Aufzeichnung des SIM-Kanals m/z = 919.3

## 5. Diskussion / Ausblick

Vergiftungen mit Amatoxinen sind immer lebensbedrohlich. Eine sichere und schnelle Bestätigung einer Amatoxinvergiftung ist deshalb sehr wichtig. Im Vergiftungsfall sind nach 12-24 h 100 % der Urine positiv, nach 48 h etwa 80 %. Im Blut (Serum) waren nach 48 h waren alle Resultate negativ. Eine Korrelation zum Schweregrad konnte nicht nachgewiesen werden.

Die beschriebene LC-MS-Bestimmung von  $\alpha$ -Amanitin in Knollenblätterpilzen, Pilzgerichten sowie in Urin und Serum ist eine sichere, robuste und relativ einfache Analysenmethode. Bei gespickten klinischen Proben (Urin, Serum, je 20 ng/ml) ergab sich eine Wiederfindung von 88 bzw. 92 %.

Mit einer Nachweisgrenze von 5 ng/ml im Urin und Serum ist die Methode, auch mit einem Single-Quadrupole Massenspektrometer, auch sehr sensitiv. In der Literatur beschriebene LS-MS/MS-Methoden sind noch ca. 10 mal empfindlicher. Für den einzigen im Handel erhältlichen ELISA-Amanitin Test (Bühlmann Laboratoires AG, CH-4124 Schönenbuch) wird eine LoQ (Limit of Quantification) von 1.5 ng/ml angegeben. Allerdings ist neben dem hohen Preis auch die begrenzte Haltbarkeit der Reagenzien limitierend.

Bei allen Pilzvergiftungen mit Amatoxinen ist  $\alpha$ -Amanitin die Leitsubstanz, auf die Bestimmung von weiteren Amatoxinen wurde deshalb verzichtet. Für das schnelle Screening von Verdachtsproben ist das in diesem Bericht beschriebene LC-MS-Verfahren aber gut geeignet.

$\alpha$ -Amanitin ist auf der NATO-Liste der gefährlichen Toxine aufgeführt.  $\alpha$ -Amanitin ist resistent gegen Kochen und wird auch nicht durch die Proteasen im Magentrukt zerlegt. Es besitzt deshalb eine gewisse Bedeutung als Terrorgift.

Die Pilzkontrollstelle Thun mit dem Giftpilzexperten Herrn Heger (Pilzsachverständiger für das Spital Thun) würde eine Zusammenarbeit begrüßen.

## 6. Literatur

- [1] Wikipedia; Freie Enzyklopädie.  
(<http://de.wikipedia.org/wiki/Amatoxine>)
- [2] A. Scholler, A. Regeniter: Intoxikation mit Amanitinen (Knollenblätterpilz); Kantonsspital-Zentrallabor, Universität Basel, Basel, Schweiz.  
([http://gtfch.org/cms/images/stories/media/tk/tk67\\_3/scholer.pdf](http://gtfch.org/cms/images/stories/media/tk/tk67_3/scholer.pdf))
- [3] E. Teuscher, U. Lindequist: Biogene Gifte; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, ISBN 978-3-8047-2438-9, 2010.
- [4] J. Anderl: Synthese und Cytotoxizität membranpermeabler Phallotoxine (Dissertation); Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2003.  
(<http://d-nb.info/969960514/34>)
- [5] Langer, M. Vesconi S, Costantino D, Busi C: Pharmacodynamics of amatoxins in human poisoning as the basis for the removal treatment: In: Faulstich H, Kommerell B, Wieland TH: Amanita toxins and poisoning 90-95, Gerhard Witzstock, Baden-Baden, (1980).
- [6] M. Tanahashi et al.: Simple analysis of  $\alpha$ -amanitin and  $\beta$ -amanitin in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry, Forensic Toxicol (2010) 28: 110-114.

**LS 2014-11**

- [7] D. Jansson et al.: A concept study on identification and attribution of chemical threat agents using liquid chromatography-mass spectrometry applied to Amanita toxins in food, Forensic Science International 221 (2012) 44-49.
- [8] T. Gicquel et al.: Amatoxins ( $\alpha$ - and  $\beta$ -Amanitin) and Phallotoxin (Phalloidin) Analyses in Urines Using High-Resolution Accurate Mass LC-MS Technology, Journal of Analytical Toxicology (2014).
- [9] Z. Zhou et al: Determination of  $\alpha$ -Amanitin in Human Serum by Solid-Phase Extraktion Coupled with HPLC-UV, Volume 29, Issue 8, 2011.

Visiert:



Prof. Dr. med. Stephen Leib  
Chef Biologie

Der Verfasser:



Werner Arnold  
Biologie

Verteiler:

CAM, LEIB, STRM, SCHN, GAEU, SIG, SCM, AV, AW (2), BUA, Bibl.,  
Reg. (321.4-Toxine/Amanitin)