Patologie 3-10 16.7.2010 14:50 Str. 36
proLékaře.cz | 16.12.2026

3,5-DIMETHOXYFENOL – MARKER INTOXIKACE TISEM ČERVENÝM

Stříbrný J.[1,2], Dogoši M.[1], Šňupárek Z.[1], Toupalík P.[3], Baláž P.[3], Bartoš P.[3]
[1]Vojenský ústav soudního lékařství ÚVN, U vojenské nemocnice 1200, 169 02 Praha 6
[2]Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové
[3]Oddělení soudního lékařství, Pardubická krajská nemocnice, Kyjevská 44, 532 03 Pardubice

Souhrn

Při smrtelné intoxikaci tisem není pitevní nález charakteristický. Na intoxikaci může upozornit přítomnost rostlinných zbytků v trávicím traktu. Při požití odvaru z tisu však v trávicím traktu rostlinné zbytky nalezeny nejsou. V tomto případě může na intoxikaci tisem upozornit nález 3,5-dimethoxyfenolu v sekčním materiálu. Autoři tohoto článku popisují průkaz a stanovení 3,5-dimethoxyfenolu u dvou případů sebevražedné intoxikace tisem. U obou případů byla použita extrakce kapalina/kapalina a extrakce na pevné fázi. Byly analyzovány extrakty získané z kyselého a bazického prostředí. Extrakty z kyselého prostředí byly methylovány, z bazického prostředí acetylovány. Analýza byla provedena metodou GC/MS. V krvi dvou smrtelně intoxikovaných osob byla stanovena hladina 3,5-dimethoxyfenolu 82 ng/ml resp. 417 ng/ml. Přítomnost 3,5-dimethoxyfenolu byla dále prokázána v žaludečním obsahu a v moči.

Klíčová slova: 3,5-dimethoxyfenol – tis červený – intoxikace – GC/MS

Summary

3,5-Dimethoxyfenol – Marker Intoxication with Taxus baccata

Autopsy findings of fatal intoxication with yew (Taxus baccata) are nonspecific. A presence of plant residues in the digestive tract can signalize yew intoxication. If yew decoction is consumed, plant residues are not found. In such a case the intoxication can be signalized by the presence of 3,5-dimethoxyphenol in biological material. Authors of this article describe the proof and quantification of the 3,5-dimethoxyphenol in two cases of fatal intoxication with yew. In both cases the liquid/liquid extraction and solid phase extraction was used. Extracts obtained from the acidic and basic environment were analysed. Extracts from the acidic environment were methylated and the extracts from the basic environment were acetylated. The analyses were carried out by gas chromatography/mass spectrometry. In the blood of both intoxicated persons the presence of 3,5-dimethoxyphenol was proved and its concentration 82 ng/ml and 417 ng/ml was quantificated. In both cases the presence of 3,5-dimethoxyphenol was also proved in the gastric contents and urine.

Key words: 3,5-dimethoxyphenol – Taxus baccata – intoxication – GC/MS

Soud. Lék., 55, 2010, No. 3, p. 36–39

ÚVOD

Tis červený (*Taxus baccata*), dříve hojný strom v přírodě, je dnes k vidění hlavně v parcích a zahradách. Strom opředený pověstmi a černou magií byl dříve užíván při přípravě čarodějných lektvarů. V *Macbethovi* potřebovala čarodějnice při přípravě lektvaru kromě jiných ingrediencí i „*játra žida rouhače, kozí žluč a tisu prut, při měsíci uříznut*". Známé byly ale i léčebné vlastnosti tisu. Avicenna se ve své práci *Medicamenta Cordialia* zmiňuje o zklidňujícím působení tisu na srdce. Devět století poté popisuje Tekol efekty pseudoalkaloidu taxinu na srdeční sval a prokazuje, že taxin je blokátorem kalciového kanálu (8, 9). A právě taxinu obsaženému v tisu je připisován hlavní toxický účinek této rostliny.

Při smrtelné intoxikaci tisem není pitevní nález charakteristický. Na intoxikaci může upozornit přítomnost rostlinných zbytků v trávicím traktu. Rostlinné zbytky jsou makroskopicky i mikroskopicky určeny a toxikologické vyšetření sekčního materiálu je již cíleno na průkaz látek, které se v tisu vyskytují. Pro tento typ analýzy bývá užívána tenkovrstevná chromatografie (TLC) (3, 7, 10) a dále zlatý standard pro průkaz této intoxikace – kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem (LC/MS) (1, 2). V případě použití TLC bývá porovnáván extrakt z jehličí tisu s extraktem ze sekčního materiálu a průkaz intoxikace je založen na nálezu látek shodné povahy v obou extraktech. Při použití metody LC/MS je průkaz intoxikace tisem založen na nálezu a případně kvantifikaci taxinu v sekčním materiálu.

Při požití odvaru z tisu však v trávicím traktu rostlinné zbytky nalezeny nejsou. V tomto případě může na intoxikaci tisem upozornit nález 3,5-dimethoxyfenolu (DMF). Tento fenol se v tisu vyskytuje jak ve volné formě, tak ve formě glykosidu taxicatinu, který je typickou součástí jehličí tisu. DMF lze v sekčním materiálu nalézt při hledání toxikologicky významné neznámé látky. V literatuře je popsán průkaz 3,5-dimethoxyfenolu v biologickém materiálu metodou extrakce kapalina/kapalina s následnou analýzou extraktu metodou plynové chromatografie s hmotnostním detektorem (GC/MS) (4) nebo kapalinové chromatografie s UV detektorem (HPLC/UV) (6).

Autoři tohoto článku popisují průkaz a stanovení DMF u dvou případů sebevražedné intoxikace tisem. U obou případů byla použita extrakce kapalina/kapalina (L/L) a extrakce na pevnou fázi (SPE). Extrakty byly analyzovány metodou GC/MS.

Patologie 3-10 16.7.2010 14:50 Str. 37
proLékaře.cz | 16.11.2026

MATERIÁL A METODIKA

POPIS PRVNÍHO PŘÍPADU SMRTELNÉ INTOXIKACE TISEM

Osmadvacetiletý muž byl nalezen mrtvý ve sklepě rodinného domku. Soudně lékařskou pitvou těla zemřelého bylo zjištěno: akutní katarální zánět jícnu s odlupováním epitelu (později bylo zjištěno, že zemřelý požil odvar tisu s příměsí louhu), akutní povrchový zánět žaludku, drť rostlinného materiálu v žaludku a dvanáctníku (v suchém stavu 3,6 g), krevní výronky v měkkých pokrývkách lebních, pod poplicnicí a přísrdečníkem, otok mozku, hemoragický otok plic místy s krvácením do alveolů, překrvení parenchymatózních orgánů, tekutý stav krve.

K toxikologickému rozboru byla dodána krev, moč, část tkáně mozkové a plicní, část jaterní a ledvinné tkáně a žaludeční obsah spolu s obsahem dvanáctníku. V krvi a moči byla prokázána přítomnost 3,5-dimethoxyfenolu a 11-nor-Δ^9-tetrahydrokanabinol-karboxylové kyseliny. Přítomnost 3,5-dimethoxyfenolu byla dále prokázána v žaludečním a dvanáctníkovém obsahu. V žaludečním obsahu a v moči byla metodou TLC prokázána přítomnost látek shodné povahy s látkami obsaženými v tisu. Přítomnost další toxikologicky významné látky nebyla v dodaném sekčním materiálu prokázána (alkohol, toxické těkavé látky, OPL nebo léky).

Morfologickým a anatomickým hodnocením drtě rostlinného materiálu nalezené v žaludečním a dvanáctníkovém obsahu zemřelého bylo zjištěno, že jde o jehličí a drobné větévky dřeviny tisu červeného (hodnocení provedeno RNDr. Dagmar Novou).

POPIS DRUHÉHO PŘÍPADU SMRTELNÉ INTOXIKACE TISEM

Dvaadvacetiletý muž byl nalezen mrtvý v areálu psychiatrické léčebny.

Soudně lékařskou pitvou těla zemřelého bylo zjištěno: tělo bez zevních úrazových změn, tmavě červenofialové posmrtné skvrny, mydriáza, překrvení spojivek. Vnitřní prohlídkou byly zjištěny obecné známky dušení, dilatace pravé komory, přítomnost velkého množství zelených jehliček v žaludku, méně v tenkém střevě – makroskopicky podezření na rostlinu tis. Histologickým vyšetřením myokardu zjištěn edém intersticia a ojediněle zvýšená eosinofilie myocytů.

Metodou LC/MS byla v krvi a žaludečním obsahu prokázána přítomnost taxinu B, isotaxinu B a dalších obsahových látek tisu (analýza provedena RNDr. M. Staňkovou, Ph.D.). Metodou GC/MS byla v krvi a žaludečním obsahu prokázána přítomnost 3,5-dimethoxyfenolu. Přítomnost jiné toxikologicky významné látky nebyla v dodaném sekčním materiálu prokázána (alkohol, OPL nebo léky).

Extrakce sekčního materiálu metodou L/L

Vzorky biologického materiálu (moč, žaludeční obsah, vzorek jaterní a ledvinné tkáně) byly zpracovány běžným postupem užívaným pro analýzu metodou TLC (extrakce z kyselého a bazického prostředí do diethyletheru, včetně extrakce močového hydrolyzátu – kyselá hydrolýza).

Extrakce krve a moče metodou SPE

Krev a moč (2 ml) byly extrahovány metodou SPE (Bond Elut Certify) dle návodu výrobce pro extrakci neznámé látky (úprava vzorku 0,1 M fosfátovým pufrem pH 6, proplach kolonky metanolem a fosfátovým pufrem, nadávkování vzorku, proplach kolonky vodou, 0,01 M roztokem kyseliny octové, vysušení kolonky a frakční eluce nejprve kyselých a neutrálních látek směsí aceton:chloroform = 1 : 1 a dále bazických látek směsí octan ethylnatý: koncentrovaný vodný roztok amoniaku = 98 : 2). Získané extrakty byly odpařeny do sucha při pokojové teplotě pod proudem dusíku.

Derivatizace extraktu získaného z kyselého prostředí

K odparku byl přidán tetramethylamonium hydroxid (7 mg) a dimethylsulfoxid (150 ml). Po promíchání byla směs 2 minuty ponechána v klidu a poté k ní byl přidán methyljodid (10 ml). Směs byla opět promíchána a ponechána dvě minuty v klidu. Ke směsi byl přidán 0,1 N roztok kyseliny chlorovodíkové a po promíchání byla reakční směs extrahována směsí hexan: octan ethylnatý = 75 : 25. Organická vrstva byla oddělena a odpařena. Odparek byl rekonstituován 50 μl octanu ethylnatého a 1 μl roztoku byl nadávkován do GC/MS systému.

Derivatizace extraktu získaného z bazického prostředí

K odparku byl přidán pyridin a anhydrid kyseliny octové. Směs byla zahřívána na 80 °C po dobu dvaceti minut a odpařena do sucha pod proudem dusíku. Odparek byl rekonstituován 50 μl octanu ethylnatého a 1 μl roztoku byl nadávkován do GC/MS systému.

Kalibrace

Kalibrátory byly extrahovány metodou SPE stejným způsobem jako vzorky. Bylo použito pět kalibračních bodů o koncentraci 0, 100, 250, 500 a 750 ng/ml 3,5-dimethoxyfenolu v séru. Jako vnitřní standard byl použit propofol o koncentraci 500 ng/ml. Kalibrační křivka byla lineární v celém rozsahu použitých koncentrací. Limit detekce LOD = 50 ng/ml.

GC/MS analýza

Přístroj Thermo Trace DSQ, kolona HP-5MS-UI, 15 m/0,25 mm/0,25 mm, splitless 30 s, teplota nástřikového prostoru 220 °C, chromatografická pec: počáteční teplota 70 °C, konečná 300 °C, teplota převodníku 250 °C, sledované ionty m/z 40–530.

Tab. 1. Sumární tabulka výsledků analýzy sekčního materiálu z prvního i druhého případu sebevražedné intoxikace tisem červeným

	Materiál	Metoda extrakce	
		LL	SPE
Případ I.	žaludeční obsah	DMF prokázán v kyselém i bazickém extraktu	neprovedeno
	vzorek jaterní a ledvinné tkáně	DMF neprokázán	neprovedeno
	krev	neprovedeno	82 ng/ml DMF v kyselém extraktu
	moč	stopové množství DMF v kyselém extraktu	stopové množství DMF v kyselém extraktu
Případ II.	krev	neprovedeno	417 ng/ml DMF v kyselém extraktu
	žaludeční obsah	DMF prokázán v kyselém i bazickém extraktu	neprovedeno

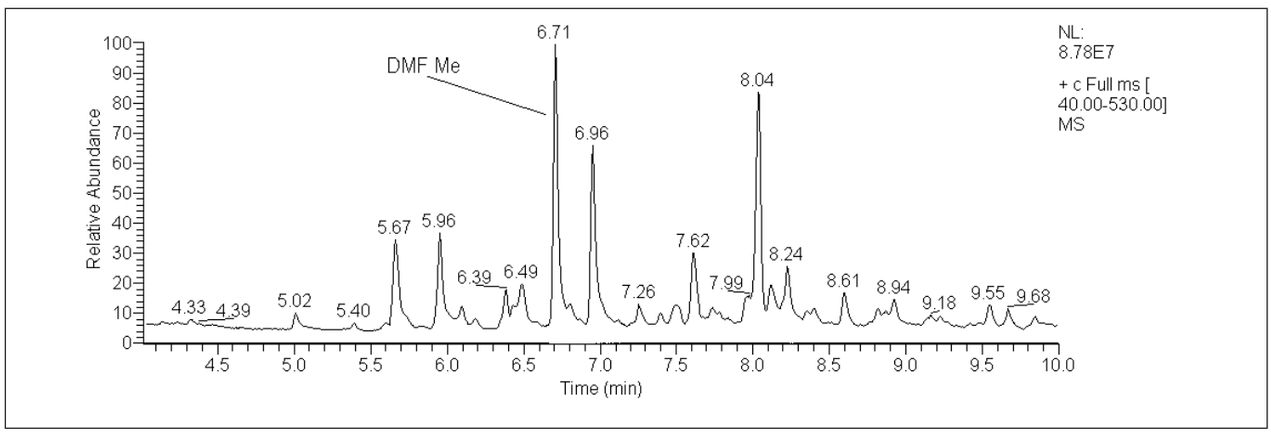
Patologie 3-10 16.7.2010 14:50 Str. 38
proLékaře.cz | 16.11.2026

VÝSLEDKY

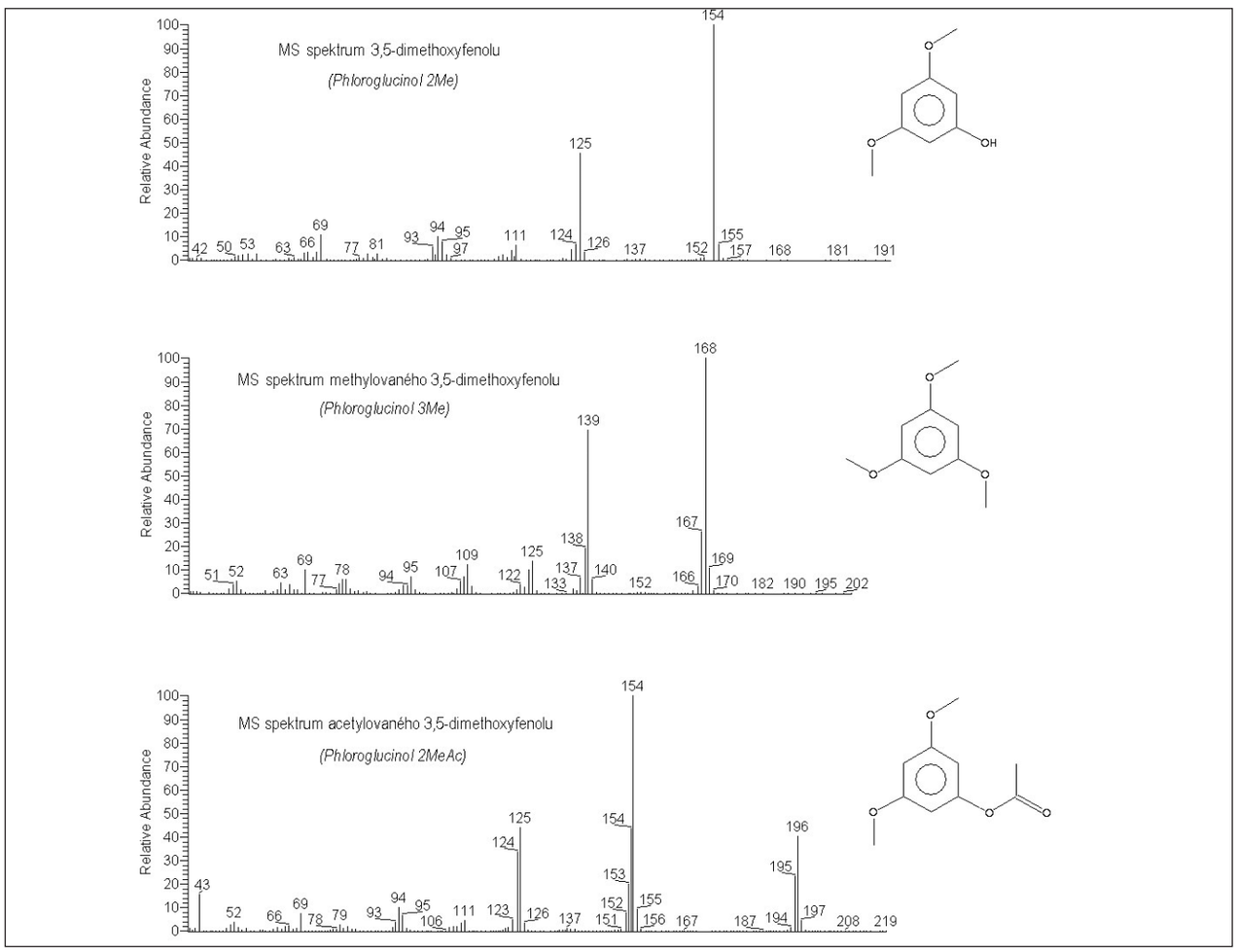
V extraktu močového hydrolyzátu (kyselá hydrolýza) nebyl 3,5-dimethoxyfenol prokázán. V tabulce 1 jsou uvedeny výsledky získané analýzou extraktů z kyselého a bazického prostředí.

DISKUSE

Intoxikace tisem není běžný, ale ani raritní způsob otravy. Pokud z anamnestických nebo pitevních údajů není zřejmé, že se jedná o intoxikaci tisem, toxikolog hledá neznámou látku. Problém u průkazu intoxikace tisem je především v tom, že



Obr. 1. Chromatogram methylovaného extraktu žaludečního obsahu (L/L, kyselý extrakt)



Obr. 2. Hmotnostní spektrum 3,5-dimethoxyfenolu, methylovaného 3,5-dimethoxyfenolu a acetylovaného 3,5-dimethoxyfenolu

Patologie 3-10 16.7.2010 14:50 Str. 39
proLékaře.cz | 16.12.2026

účinné látky (pseudoalkaloid taxin B a isotaxin B) nejsou běžně dostupné, a proto je toxikologická laboratoř s největší pravděpodobností nemá „na skladě“. Navíc tyto látky nelze analyzovat metodou GC/MS pro jejich polaritu a nemožnost převést je bez rozkladu do plynného skupenství. Z tohoto důvodu nejsou v elektronických knihovnách uvedena jejich CG/MS spektra. Při standardním toxikologickém vyšetření metodou GC/MS je ale možné v extraktu biologického materiálu prokázat přítomnost doprovodných látek, které se spolu s taxiny vyskytují v tisu. V literatuře popsaný 3,5-dimethoxyfenol je možné zachytit, aniž bychom museli použít cílenou nebo jinak speciální metodu analýzy. Jeho přítomnost lze v biologickém materiálu prokázat běžnými analytickými postupy používanými v toxikologické laboratoři (extrakce kapalina/kapalina, extrakce na pevné fázi, analýza metodou GC/MS nebo HPLC/UV). Disociační konstanta pKa 3,5-dimethoxyfenolu je rovna 9.34. Je výhodnější extrahovat tuto látku z kyselého nebo neutrálního prostředí. V případě vysoké koncentrace (žaludeční obsah) přechází i do extraktu bazického.

Při analýze extraktů metodou GC/MS (obr. 1) je přítomnost aktivního vodíku v molekule fenolu mírnou překážkou pro zdárný průběh chromatografického procesu. DMF lze snadno derivatizovat výše popsanými způsoby a tím nepříznivé působení aktivního vodíku odstranit. V případě masivního výskytu DMF (např. žaludeční obsah) nebude problém detekovat tento fenol i bez derivatizace.

Hmotnostní spektrum DMF (obr. 2) je v knihovně NIST vedeno pod názvem *Phloroglucinol dimethyl ether.* Dále je v této knihovně spektrum methylovaného derivátu DMF vedené pod názvem *Phloroglucinol trimethyl ether.* V toxikologické knihovně PMW (2. vydání) je uvedeno spektrum methylovaného DMF pod názvem *Phloroglucinol 3ME* a acetylovaného DMF pod názvem *Phloroglucinol 2MEAC.*

Nález DMF v sekčním materiálu však nelze považovat za důkaz intoxikace tisem. DMF lze nalézt i v jiných rostlinách, např. v čínské růži *Rosa chinensis,* routě vonné *Ruta graveolens* nebo v hroznovém vínu (5). Nález DMF je však silná nápověda, kterým směrem se v dalším pátrání vydat.

LITERATURA

1. **Beike, J., Karger, B., Meiners, T., Brinkmann, B., Köhler, H.:** LC-MS determination of Taxus alkaloids in biological specimens. Int J Legal Med 117, 2003, s. 335–339.
2. **Frommherz, L., Kintz, P., Kijewski, H., Köhler, H., Lehr, M., Brinkmann, B., Beike, J.:** Quantitative determination of taxine B in body fluids by LC-MS-MS. Int J Legal Med 120, 2006, s. 346–351.
3. **Kosatík, A., Smysl, B.:** Chemické toxikologické vyšetření při smrtelné otravě tisem. Scripta medica 51, 1978, s. 118–119.
4. **Musshoff, F., Jacob, B., Fowinkel, C., Daldrup, T:** Suicidal yew leave ingestion — Phloroglucindimethylether (3,5-dimethoxyphenol) as a marker for poisoning from Taxus baccata. Int J Legal Med 106, 1993, s. 45–50.
5. **Musshoff, F., Madea, B.:** Modern analytical procedures for the determination of taxus alkaloids in biological material. Int. J. Legal Med. 122, 2008, s. 357–358.
6. **Pietsch, J., Schulz, K., Schmidt, U., Andresen, H., Schwarze, B., Dreßler, J.:** A comparative study of five fatal cases of *Taxus* poisoning. Int J Legal Med 121, 2007, s. 417–422.
7. **Stříbrný, J., Dogoši, M., Šňupárek, Z., Černá, I., Sokol, M.:** TLC Proof of Intoxication by Taxus Baccata:. Chem. Listy 101, 2007, s. 275–276.
8. **Tekol, Y.:** Negative chronotropic and atrioventricular blocking effects of taxine on isolated frog heart and its acute toxicity in mice. Planta Med, 5, 1985, s. 357–360.
9. **Tekol, Y., Kameyama, M.:** Elektrophysiologische Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Eibentoxins Taxin auf das Herz. Arzneimittelforschung, 37, 1987, s. 428–431.
10. **Vaněrková, H., Lysenková, A.:** Toxikologický nález po požití tisu. Folia Fac Med Univ Comenianae Bratisl, Suppl. *1990*, s. 157–163.

Kontakt:
Ing. Jan Stříbrný, Vojenský ústav soudního lékařství ÚVN
U vojenské nemocnice 1200
169 02 Praha 6
tel.: 973 203 518
jan.stribrny@uvn.cz