

G. CAMPAGNARI, F. TAGLIARO & F. ALBERTON

DETERMINAZIONE DELLE AMANITINE MEDIANTE RP-HPLC CON RIVELAZIONE ELETTROCHIMICA

Riassunto - G. CAMPAGNARI, F. TAGLIARO & F. ALBERTON - Determinazione delle amanitine mediante RP-HPLC con rilevazione elettrochimica.

I metodi analitici di cromatografia liquida per la misurazione delle amanitine riportati in letteratura impiegano, in generale, detector UV che risultano di scarsa sensibilità. Abbiamo pertanto messo a punto un metodo HPLC che impiega un sistema di rilevazione elettrochimico ed una colonna butilica a pori grandi risultata di particolare efficienza, consentendo un limite di sensibilità di circa 40-80 pg di alfa, beta, gamma-amanitina. Questo sistema cromatografico, accoppiato con una duplice estrazione dei campioni di siero su cartucce di silice derivatizzata con ODS e non derivatizzata, ha permesso la misurazione di basse quantità di alfa-amanitina (10-20 ng/ml). Per le urine, invece, è stata sperimentata un' estrazione con anticorpi in fase solida che ha permesso di misurare 1-3 ng/ml di tossina.

INTRODUZIONE

Viene da tempo ripetutamente proposta la determinazione delle amanitine nei liquidi biologici di sospetti intossicati da funghi, data la difficoltà di formulare precocemente una diagnosi certa sulla base dei soli dati anamnestico-clinici.

Anche sullo stretto piano di applicazione medico-legale del resto, la certezza della diagnosi si impone, specie se si considera che, sulla base di una recente sentenza del Tribunale di Verona (19.05.86: Pres. Resta) (1), l'indurre al consumo di funghi velenosi altre persone può configurare reato di lesioni o di omicidio, inquadrabile nell'ambito del delitto colposo (a titolo di imprudenza) o doloso.

Tali evenienze pongono quindi problemi di diagnosi certa anche nell'ambito medico-legale, dove i criteri di affidabilità dell'indagine sono particolarmente stringenti.

Su questa base sono stati sviluppati numerosi metodi analitici per identificare le amanitine in campioni biologici. Particolare attenzione è stata rivolta all' α -amanitina, data la sua tossicità (DL50 0,3 mg/kg nel topo) e l'elevata concentrazione nella matrice fungina (circa 80 mg/kg) (2).

Radioimmunoassays (RIA) per le amanitine, con sensibilità nell'ordine dei nanogrammi per millilitro, sono stati pubblicati già alla metà degli anni '70 da Faulstich (3) e Fiume (4). Più recentemente ulteriori miglioramenti della sensibilità sono stati ottenuti dallo stesso Faulstich utilizzando un RIA in fase solida (5) e da Andres mediante un diverso antisiero e un tracciante iodinato (6). I migliori metodi RIA consentono oggi sensibilità nell'ordine del ng/mL. Tuttavia è noto che i risultati dei metodi immunometrici possono risentire di interferenze specifiche (cross-reazioni) e aspecifiche (pH, forza ionica ecc.). Questo ha indotto la Sezione Tossicologica dell'Accademia Americana di Scienze Forensi a raccomandare una conferma dei risultati di metodi analitici immunometrici mediante tecniche basate su principi diversi, ma di paragonabile sensibilità (7).

L'alternativa di gran lunga più utilizzata è rappresentata, come è noto, dalla cromatografia. Tra i metodi cromatografici, tuttavia, la cromatografia su strato sottile (TLC) si è rivelata utile esclusivamente per l'analisi del materiale fungino (8). La sua scarsa sensibilità infatti ne limita l'impiego alla determinazione di livelli nettamente superiori a quelli rinvenibili nei soggetti intossicati.

L'uso della gas-cromatografia è invece ostacolato dalla natura termolabile e dal notevole peso molecolare delle amanitine.

La cromatografia liquida ad elevata risoluzione (HPLC) è stata proposta da numerosi Autori, per le sue caratteristiche di compatibilità con analiti complessi, quali le molecole naturali, l'elevata sensibilità ed l'affidabilità.

Già nel 1982 Pastorello e coll. hanno impiegato un sistema HPLC in fase inversa su ODS-silica con rivelazione UV a 302 nm. In tali condizioni la minima quantità determinabile di α -amanitina era 10 ng (9). Metodi cromatografici simili sono stati proposti successivamente con limiti di determinazione sempre nell'ordine del ng (10-13).

Il problema principale di questi metodi rimane tuttavia la scarsa sensibilità consentita dalla rivelazione spettrofotometrica (assorbimento UV a 280-313 nm), decisamente inferiore a quella consentita dal RIA. Anche la selettività del sistema di rivelazione è piuttosto modesta. Considerata anche la scarsa efficienza nella separazione delle amanitine delle colonne cromatografiche utilizzate (ODS-silica a pori di 60-100 Å), la sensibilità nella matrice biologica e, sotto certi aspetti, la specificità risultano piuttosto limitate.

Sulla base di questi dati, abbiamo recentemente sviluppato un metodo HPLC

che impiega un sistema cromatografico in fase inversa con colonna impaccata con silice a pori grandi (300 Å), derivatizzata con gruppi butilici, in grado di favorire le interazioni di molecole grandi con la fase stazionaria. È stato inoltre sperimentato l'impiego di un rivelatore elettrochimico (ED), che, data la presenza nella struttura delle amanitine di gruppi ossidabili, ha consentito di incrementare sia la sensibilità che la specificità analitica.

MATERIALI, METODI E RISULTATI

Standard di α -, β - e γ -amanitina sono stati ottenuti dalla ditta Serva (Heidelberg, FRG).

Tutti i solventi utilizzati erano «HPLC grade».

È stato impiegato un cromatografo isocratico Gilson (Villiers-le-Bel, Francia), equipaggiato con una colonna Hypersyl WP 300 Butyl 5 μ m (Shandon, Sewickley PA, USA) di 250 x 4.6 mm e con un detector amperometrico a singola cella in «glassy carbon» (Bio-Rad, Richmond CA, USA). Nelle condizioni operative finali il potenziale di lavoro dell'elettrodo era +0.6 V contro un riferimento in Ag/AgCl. In serie era inoltre collegato un detector UV (875 Jasco, Tokyo) regolato sulla lunghezza d'onda di 303 nm.

La fase mobile era costituita da una miscela di ammonio acetato 0.02 mol/L in H₂O portato a pH 5 con acido acetico ed acetonitrile nel rapporto di 92 : 8.

Nelle condizioni cromatografiche descritte le tre amanitine sono eluite nell'ordine β -, α - e γ - con tempi di ritenzione di circa 12, 16 e 34 min e risultano ben separate, anche se la ritenzione della γ -amanitina è decisamente elevata. Data tuttavia la scarsa importanza pratica della sua determinazione, non abbiamo ritenuto opportuno sacrificare la separazione delle altre due più importanti tossine. Naturalmente un aumento di acetonitrile nell'eluente potrebbe ottimizzare la determinazione della γ -amanitina, qualora fosse necessario.

L'efficienza della separazione è del tutto accettabile, risultando di circa 20.000 piatti/metro, contro i circa 10.000 calcolabili dalle pubblicazioni degli Autori che impiegano colonne tradizionali.

I voltammogrammi idrodinamici delle tre amanitine sono risultati molto simili con un plateau a +0.6 V ed E_{1/2} di circa 0.45 V (14). Sulle base di queste osservazioni si è deciso di impiegare un potenziale di 0.6 V in quanto esso permette di lavorare in condizioni di plateau, con livelli ancora modesti di corrente di fondo.

In queste condizioni la minima quantità determinabile è risultata circa 40 pg di α -amanitina, 80 di β - e 70 di γ - (con un rapporto segnale/ rumore = 5), vale a dire circa 100 volte inferiore a quella misurabile con determinazione UV.

Sino ad ora, non abbiamo ottimizzato la preparazione del campione. Per

tanto nell'analisi di campioni biologici ci siamo limitati ad adottare con piccole modifiche una procedura consigliata recentemente da Fenoil e coll. (13).

In sintesi 2 mL di siero sono caricati su una cartuccia Sep-Pak C18 (Millipore, Milford, MS, USA), previamente attivata con 2 mL di acetonitrile e 2 mL di acqua. Dopo un lavaggio con 5 mL di acqua, le amanitine sono eluite con 2 mL di una miscela di metanolo/acqua (40/60). L'eluato è quindi riestratto con 4 mL di una miscela di metanolo/cloroformio (50/50), che è poi portata a secco. Il residuo è ripreso in 400 μ L di cloroformio/metanolo/acido acetico (80/50/4.5) e caricato su una Sep-Pak Silica. Dopo un lavaggio con diclorometano/metanolo (70/30), le amanitine sono eluite con 1.2 x 2 mL di diclorometano/metanolo (50/50). Finalmente l'eluato è portato a secco, ridisciolto in fase mobile ed iniettato.

Si è osservato che, mentre i picchi dell' α - e γ -amanitina sono ben separati, la β -amanitina è parzialmente sovrapposta ad un picco della matrice. Questo limita la sensibilità, ma riteniamo che il problema potrebbe essere facilmente risolto con piccole modifiche della fase mobile, qualora fosse necessario.

Il recupero e la riproducibilità del metodo appaiono del tutto soddisfacenti limitatamente all' α -amanitina (14). β - e γ -amanitina sono estratte con bassa efficienza, richiedendo pertanto condizioni di estrazione da ottimizzare.

La descritta procedura di estrazione non si è invece rivelata idonea alla preparazione di campioni di urina, che presentavano numerose interferenze.

In via del tutto preliminare è stato tentato l'impiego di un'immunoassorbente, costituito dall'antisiero in fase solida, legato su net di nylon (0.56 cm²), distribuito dal Max Planck Institute di Heidelberg, nei kit di reagenti per RIA.

In sintesi, un net con antisiero immobilizzato è stato incubato per 16 h in 1 mL di urina di un soggetto intossicato da *Amanita Phalloides*, portato a pH 7,5 con l'aggiunta di 1 mL di tampone fosfato 0,1 mol/L. Dopo un lavaggio con 2 x 3 mL di soluzione salina fisiologica, le amanitine sono state eluite con 200 μ L di tampone fosfato 0,05 mol/L (pH 5) contenente il 30% di metanolo e quindi iniettate nel cromatografo.

La bassa capacità legante dei nets, con conseguente loro rapida saturazione, tuttavia, limita nettamente la linearità dell'estrazione. Risultati preliminari su urine di soggetti intossicati sono stati particolarmente incoraggianti.

DISCUSSIONE

Il metodo descritto rappresenta un notevole miglioramento rispetto a quanto presentato in letteratura per quanto riguarda l'efficienza del sistema cromatografico e soprattutto la sensibilità.

I miglioramenti dal punto di vista della cromatografia sono riconducibili

all'impiego di una colonna a pori grandi che permettono un migliore trasferimento di massa nel caso di molecole con un massa notevole. In pratica questo si traduce nella possibilità di impiegare tempi di ritenzione maggiori, con migliore risoluzione da composti interferenti, senza eccessivi allargamenti di picco.

La presenza di un residuo di 6-idrossi triptofano nella struttura delle amanitine, ci ha indotto a tentare l'impiego della determinazione elettrochimica. Le nostre osservazioni ci portano a ritenere che il processo elettrochimico di ossidazione che abbiamo verificato avvenga a carico dell'ossidril fenolico.

La determinazione elettrochimica ha consentito di abbassare nettamente la minima quantità determinabile.

La possibilità di selezionare le specie chimiche rilevabili mediante la variazione del potenziale di ossidazione, incrementa notevolmente anche la selettività. In pratica questo dovrebbe consentire di semplificare drasticamente la preparazione del campione, anche in analogia con quanto ottenuto nell'analisi di altri composti fenolici, ma questa parte del lavoro è ancora in fase di messa a punto.

Un'ultima osservazione riguarda i risultati ancora preliminari, ma certamente incoraggianti, ottenuti con l'immuno-estrazione dei campioni. Questa tecnica sembra poter rappresentare un mezzo semplice ed estremamente specifico, di applicabilità più generale, per il trattamento di matrici complesse, in cui si debbano determinare analiti a bassissima concentrazione.

BIBLIOGRAFIA

1. ALBERTON F., FURIA A.: Considerazioni medico-legali su un caso di duplice avvelenamento riferito al fungo *Lepiota Brunneoincarnata* Chod. Mart. Il Fracastoro, 1-2: 64-68, 1982.
2. FIUME L.: Meccanismo d'azione dei principali veleni della *Amanita Phalloides* (amanitine). Rec. Prog. Med., 56, 547-553, 1974.
3. FAULSTICH H., TRISCHMANN H., ZOBLEY S.: A radioimmunoassay for amanitin. Febs Lett., 56, 312-315, 1975.
4. FIUME L., BUSI C., CAMPEDELLI-FIUME G., FRANCESCHI C.: Production of antibodies to amanitins as basis for their radioimmunoassay. Experientia, 31, 1233-1234, 1975.
5. FAULSTICH H., ZOBLEY S., TRISCHMANN H.: A rapid radioimmunoassay, using a nylon support, for amatoxins from *Amanita* mushrooms. Toxicon, 20, 913-924, 1982.
6. ANDRES R.Y., FREI W., GAUTSCHI K., VONDERSCHMITT D. J.: Radioimmunoassay for amatoxins by use of a rapid, 125 I-tracer-based system. Clin. Chem., 32, 1751-1755, 1986.

7. FINKLE B. S.: Drug-analysis technology: overview and state of art. *Clin. Chem.*, 33, 13-17, 1987
8. STIJVE T., SEEGER R.: Determination of α -, β -, and γ -amanitin by high performance thin-layer chromatography in *Amanita Phalloides* (Vail. ex Fr.) secr. from various origin. *Z. Naturforsch.*, 34c, 1133-1138, 1979.
9. PASTORELLO L., TOLENTINO D., D'ALTERIO M., PALADINO R., FRIGERIO A., BERGAMO N., VALLI A.: Determination of α -amanitin by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 223, 398-403, 1982.
10. BELLIARDO F., MASSANO G.: Determination of α -amanitin in serum by HPLC. *J. Liquid Chromatogr.*, 6, 551-558, 1983.
11. CACCIALANZA G., GANDINI C., PONCI R.: Direct simultaneous determination of α -amanitin, β -amanitin and phalloidine by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 3, 179-185, 1985.
12. JEHL F., GALLION C., BIRCKEL P., JAEGER A., FLESCH F., MINCK R.: Determination of α -amanitin and β -amanitin in human biological fluids by high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 149, 35-42, 1985.
13. FENOIL R., ALFIERI R., WEISZ G.: A rapid and sensitive HPLC method for determination of α -amanitin in urine. In «Developments in Analytical Methods in Pharmaceutical, Biomedical, and Forensic Sciences.» a cura di: Piemonte G., Tagliaro F., Marigo M., Frigerio A., plenum publishing Co., New York, 143-146, 1987.
14. TAGLIARO F., CHIMINAZZO S., MASCHIO S., ALBERTON F., MARIGO M.: Improved high performance liquid chromatography determination of amanitins with electrochemical detection. *Chromatographia*, 24, 482-486, 1987.

Indirizzo degli autori:

G. Campagnari, F. Tagliaro & F. Alberton: Istituto di Medicina Legale
e delle Assicurazioni - Università di Verona