

Ann. Mus. civ. Rovereto	Sez.: Arch., St., Sc. nat.	Suppl. vol. 8 (1992)	217-224	1993
-------------------------	----------------------------	----------------------	---------	------

S. MORETTO, F. TAGLIARO, R. DORIZZI, D. MICHELOT & M. MARIGO

## LA DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE DELL'*AMANITA PHALLOIDES*: LE MODERNE STRATEGIE ANALITICHE

**Riassunto** - S. MORETTO, F. TAGLIARO, R. DORIZZI, D. MICHELOT & M. MARIGO - La determinazione delle tossine dell'*Amanita phalloides*: le moderne strategie analitiche.

Nel presente lavoro sono descritti i metodi cromatografici (e in particolare HPLC) e non cromatografici per la determinazione delle principali tossine della *Amanita phalloide* (AP).

Dopo una sintetica trattazione della chimica e della tossicologia delle amanitine sono discussi i problemi analitici e le prospettive del laboratorio nelle intossicazioni da funghi dal punto di vista clinico, terapeutico e medico-legale.

### INTRODUZIONE

Con la cautela della scarsa ed incompleta documentazione (1), si può dire che la maggior parte degli avvelenamenti da funghi, di cui circa il 10-40% risulta letale (2-5), sia causata dalle amatossine, octapeptidi biciclici, principali tossine dell'*Amanita phalloides* (AP), e secondariamente dalle phallotossine, eptapeptidi biciclici.

Nei casi di avvelenamento l'instaurazione di terapie efficaci ma non esenti da rischi, come la diuresi forzata, trova conforto in una diagnosi obiettiva eseguibile mediante la determinazione delle tossine nei liquidi biologici (6); tale determinazione è inoltre indispensabile nei casi che presentano implicazioni medico-legali.

Come è noto in corso di intossicazione il paziente, dopo una latenza di 6-8 ore, presenta nausea, vomito, dolore addominale e diarrea profusa e solo successivamente l'ittero. I casi letali sono causati da gravi ed irreversibili danni epatici, renali e gastro-enterici con ampia distruzione cellulare (7).

L'azione delle amatossine consiste in un blocco della sintesi proteica per inibizione della RNA-polimerasi di tipo II, mentre quella delle phallotossine, che si estrinsecherebbe a livello dell'actina, è di minore rilevanza, ma sembra comunque potenziare l'azione delle amatossine (8).

La terapia dell'avvelenamento da AP è difficile e impegnativa per il paziente: infatti l'amatossina deve essere rimossa dai suoi recettori nei nuclei cellulari. Autori diversi hanno proposto diuresi forzata, emodialisi e plasmateresi (8) e, recentemente, il trapianto di fegato (9-10).

#### DETERMINAZIONE DI AMATOSSINE E PHALLOTOSSINE

##### *Metodi non cromatografici*

La tecnica radioimmunologica (RIA) è certamente quella più impiegata; tuttavia va tenuto presente che la bassa antigenicità ed elevata tossicità intrinseca delle amatossine (11) hanno ostacolato per molti anni l'allestimento di sensibili metodi immunometrici, soprattutto a causa di problemi nell'immunizzazione: il complesso amanitina/aptene risultava infatti essere scarsamente antigenico (12), e/o notevolmente tossico, causando la morte degli animali che venivano immunizzati (13).

Fiume propose nel 1975 il primo metodo RIA (14): l'anticorpo veniva ottenuto nel topo impiegando come antigene un complesso amanitina-albumina. L'antisiero era usato alla diluizione 1:400 con amanitina triziata come tracciante. Dopo un'incubazione di 12 ore, la separazione era ottenuta con una soluzione di solfato di ammonio saturo. Questo metodo consentiva la determinazione di 500 pg/ml di amanitina nel siero, e la stessa poteva essere misurata in altri liquidi biologici, quali urina e succo gastro-duodenale (15). Tale sensibilità era comunque insufficiente per scopi clinici.

Sempre nel '75 è stato proposto un immunogeno di minore tossicità coniugando siero-albumina con esteri N-idrossisuccinimidici di  $\beta$ -amanitina (16); la sensibilità riportata era di 50 pg/ml e l'incubazione poteva essere ridotta da 15 ore a 4 °C a 45 minuti a 25 °C, in modo tale che il metodo poteva essere impiegato anche per diagnosi d'urgenza. Lo stesso autore in epoca più recente (17) ha proposto una metodica che impiegava come antigene derivati dell' $\alpha$ -amanitina con fetuina, efficace dal punto di vista antigenico ma molto meno tossica; l'anticorpo dopo purificazione su colonna era immobilizzato su reti di nylon attivate e dopo incubazione col marcato e un lavaggio si procedeva al conteggio della

radioattività. Malgrado la semplicità di questa tecnica la sensibilità corrispondeva a circa 3 ng/ml con un range operativo ottimale di 10-100 ng/ml; il livello di sensibilità quindi consentiva l'applicazione a campioni di urina, ma precludeva l'utilizzo nei campioni sierici per la diagnosi di avvelenamento o per il successivo monitoraggio delle procedure di disintossicazione (18).

Un miglioramento nella determinazione dell'amatossina in campioni di sangue è derivata dall'introduzione di una forma ossidata della  $\alpha$ -amanitina, chiamata aldoamanitina (19) che ha consentito la produzione di un antisiero dotato della stessa cross-reattività per  $\alpha$ - e  $\gamma$ -amanitina e del 44% della cross-reattività per  $\beta$ -amanitina. Grazie all'elevata sensibilità (100 pg/ml) e alla rapidità di analisi (tempi inferiori a 90 minuti), il metodo ha avuto una buona diffusione nei laboratori.

Infine sono stati ottenuti antisieri contro  $\beta$ -amanitina purificata per mezzo di cromatografia di affinità (19) e contro un complesso  $\beta$ -amanitina-concanavalina A (20).

Va comunque ricordato che i risultati ottenuti con metodi immunologici che possono presentare interferenze specifiche e non specifiche con la matrice, sono da confermarsi con tecniche alternative.

##### *Metodi cromatografici*

Cromatografia su strato sottile (TLC). La cromatografia su strato sottile (TLC) per l'identificazione delle amatossine ha oggi rimpiazzato la cromatografia su carta (6, 21, 22), tuttavia i limiti di sensibilità di questa tecnica ne confinano l'impiego all'analisi di estratti fungini.

Da Palyza (23) e Weiland (8) furono analizzate piastre commerciali per TLC con un doppio sistema di solventi e un sistema di rivelazione costituito da cinnamaldehyde e acido cloridico: la sensibilità ottenuta era di 50 ng.

Un'altra procedura per l'analisi quantitativa dell'amatossina prevede una fase di purificazione mediante migrazione di 120 minuti con doppio solvente e una quantizzazione spettrofotometrica della tossina con uno spettrofotometro, previa reazione con acido sulfanilico diazotato (24).

La cromatografia diretta di estratti non preventivamente purificati ha dato risultati peggiori, anche se più rapidi, rispetto ai metodi in cui la cromatografia è preceduta da una fase preliminare di estrazione (25).

La «high performance» TLC (HPTLC) riduce le fasi preliminari di preparazione del campione: Stijve e Seeger (26) hanno studiato con questa tecnica estratti di AP liofilizzati. I composti di interesse sono stati estratti con metanolo e poi analizzati con HPTLC con una fase mobile costituita di cloroformio-metanolo-acido acetico-acqua o butanolo-etilacetato-acqua. Dopo una migrazione di circa 40 minuti e una colorazione con cinnamaldehyde-acido cloridico, l'amanitina appariva come macchie rosso porpora su fondo giallo. La sensibilità di questo

metodo era di 50 ng (27), depositati sulla piastra, che corrispondono grossolanamente al massimo teorico rilevabile con questa tecnica.

#### *Cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC).*

Gli svantaggi delle tradizionali tecniche cromatografiche su colonna impiegate in passato consistono nella bassa sensibilità e nella difficoltà di ottenere una efficace quantizzazione; questo ha ripercussioni negative soprattutto nell'analisi di campioni biologici di soggetti intossicati e ha spinto numerosi autori a sviluppare metodiche HPLC. Questa tecnica, per le sue caratteristiche di riproducibilità, efficienza e rapidità, è molto adatta anche alle indagini su matrice fungina, dove è stata largamente usata.

Proprio in questo settore Caccialanza (28) propose un semplice pretrattamento del campione (due grammi) con una miscela di etanolo-acqua; il supernatante veniva mandato a secco e risospeso con 5 ml della miscela acqua-etanolo; 2 ml della sospensione venivano diluiti con acqua e poi filtrati; 20  $\mu$ l dell'estratto finale venivano iniettati nel cromatografo.

In epoca più recente Enjalbert ha messo a punto una procedura che consente il dosaggio simultaneo di 8 amatossine e phallotossine. Dieci aliquote di due grammi di AP venivano estratti con 3 ml di soluzione di metanolo-acqua-acido cloridrico 0,01 M. Dopo un'incubazione overnight a 4 °C, l'intero estratto veniva centrifugato, risospeso con 8 ml della miscela estrattiva, incubato un'altra notte a 4 °C e nuovamente centrifugato; infine 10  $\mu$ l di supernatante erano iniettati. La separazione cromatografica avveniva per gradiente; gli eluenti erano miscele costituite da acetato di ammonio 0,02 M-acetonitrile in diverse proporzioni. L'assorbimento era misurato simultaneamente a 214 e 295 nm usando un detector a diode array, in grado di registrare contemporaneamente il segnale a multiple lunghezze d'onda.

Poiché l'HPLC si è rivelata particolarmente utile per l'analisi dell'amatossina in matrici complesse, la maggior parte delle applicazioni riguarda l'analisi nei liquidi biologici.

#### *Pretrattamento del campione iper analisi di interesse clinico*

Nella semplice procedura proposta da Pastorello (29) il campione era addizionato con metanolo e centrifugato; il supernatante era concentrato a 100  $\mu$ l e 20 di questi erano iniettati. Questa semplice procedura fu adottata anche da Belliardo e Massano (30), ma le prestazioni cromatografiche risultavano modeste, soprattutto se la tecnica di rivelazione era piuttosto aspecifica come la rivelazione UV a 300 nm di lunghezza d'onda.

Caccialanza (28) ottimizzò il pretrattamento del campione per la determinazione di  $\alpha$ - e  $\beta$ -amanitina estraendo 1 ml di siero con 2 ml di una miscela etanolo-cloroformio, a cui seguivano centrifugazione, filtrazione del supernatante, concentrazione e iniezione.

Un metodo molto più selettivo - ma certamente complicato - fu quello proposto da Jehl (31) che si basava sull'uso di cartucce Sep-Pack C 18 su cui veniva caricato il campione di siero, previamente deproteinizzato con acetonitrile; come fase mobile si usavano miscele acetonitrile-acqua in diverse proporzioni; l'eluato conteneva separatamente  $\alpha$  e  $\beta$ -amanitina: dopo una fase di evaporazione e liofilizzazione il campione poteva essere iniettato.

Questo metodo molto complesso fu semplificato da Fenoil (32) che propose anche un metodo di indagine per le urine. I campioni di urina richiedevano una seconda purificazione su una cartuccia di silice: il residuo ottenuto nella prima fase di purificazione era caricato nella seconda cartuccia; dopo due lavaggi, veniva eluito con una miscela di diclorometano-metanolo ed evaporato; dopo essere stato ricostituito con la fase mobile era iniettato.

Rieck e Platt (33) hanno messo a punto un sistema HPLC in «column switching», che consente l'automatizzazione del pretrattamento del campione. L' $\alpha$ -amanitina e la phalloidina dopo deproteinizzazione, erano concentrate su una prima colonnina RP-8 e successivamente e automaticamente trasferite a una seconda colonna analitica, in serie; la durata complessiva di analisi era di 30 minuti.

La complessità della procedura di purificazione poteva essere ridotta impiegando fasi separative e di rivelazione più selettive: in questo senso si sono mossi Tagliaro e coll. (34) che hanno impiegato un rivelatore elettrochimico semplificando il metodo di preparazione proposto da Fenoil: 2 ml di campione erano caricati su una cartuccia e l'amanitina era eluita con 2 ml di una miscela acqua-metanolo, successivamente estratta con 4 ml di una soluzione metanolo-cloroformio. La fase organica era mandata a secco e il residuo veniva ridisciolto con 400  $\mu$ l di una miscela cloroformio-metanolo-acido acetico e applicati alla seconda cartuccia di silice. Gli analiti eluiti, dopo un lavaggio con una soluzione metanolo-diclorometano, erano portati a secco, ridisciolti nella fase mobile e iniettati. Nello stesso articolo gli Autori descrivono una estrazione di amanitina dalle urine usando un antisiero anti-amatossina legato a reti di nylon. Le reti erano incubate con il campione e successivamente lavate con soluzione fisiologica. L'amatossina era eluita mediante l'incubazione per 5 minuti con 200  $\mu$ l di tampone fosfato 0,05 M a pH 5 contenente il 30% di metanolo. L'eluato era iniettato nel cromatografo.

Lo stesso gruppo più recentemente ha ulteriormente semplificato la fase di estrazione impiegando una singola cartuccia C18: l'amanitina era eluita con metanolo che era poi mandato a secco; il residuo ridisciolto in acqua-acetonitrile era filtrato da un filtro a scambio anionico e veniva direttamente iniettato (35).

### Separazione cromatografica

Le condizioni di separazione utilizzate dai differenti Autori sono molto simili: con l'eccezione di Caccialanza, che adottò una separazione per gradiente (28), tutti gli altri hanno usato condizioni isocratiche e separazioni in fase inversa. Tra le differenti fasi mobili utilizzate si distingue quella impiegata da Tagliaro et Alii (35): una miscela di tampone fosfato 0,05 M-acetonitrile a pH 9,5 che consentiva di ottenere una alta risposta elettrochimica dell'amanitina; in questo caso era usata una colonna di polistirene-divinilbenzene, resistente a pH basici.

### Rivelazione e quantizzazione

La tecnica di rivelazione più usata è stata certamente l'assorbimento UV a lunghezze d'onda comprese tra 302 e 313 nm. Per ottenere una maggiore sensibilità e selettività e conseguentemente rendere più semplice la procedura di estrazione, Tagliaro (35) ha adottato la rivelazione elettrochimica, basata sulla presenza di un residuo di 6-idrossitriptofano con un ossidrilico fenolico nelle amanitine. Recentemente lo stesso gruppo ha introdotto nella metodica un eluente alcalino che ha migliorato i caratteri di elettro-ossidazione del gruppo fenolico, promuovendone l'ossidazione a bassi voltaggi, permettendo così l'uso di un voltaggio di 350 mV (35) invece di 600 mV del precedente lavoro (34).

La sensibilità delle analisi HPLC è di gran lunga migliorata negli ultimi dieci anni. Si passa da un limite di determinazione (LOD) di 500 ng/ml, 1,3 µg/ml e 0,5-1 µg/ml rispettivamente per Pastorello (29), Belliardo e Massano (30) e Caccialanza (28), a 10 ng/ml per Jehl (31), Fenoil (32) e Rieck e Platt (33). Tagliaro (34, 35) con l'uso della rivelazione elettrochimica ha portato la sensibilità a livelli di 2 ng/ml.

### CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Grazie alla sua sensibilità - fino a pochi ng/ml - accuratezza, rapidità e possibilità di automazione, l'HPLC rappresenta l'unica reale alternativa alle tecniche RIA per i laboratori di chimica clinica, soprattutto se la rapidità e la semplicità operativa saranno ottimizzate dall'uso di strumenti completamente automatici.

Nei laboratori medico-legali invece, proprio per la già menzionata necessità di confermare i risultati con almeno due tecniche non correlate (36), l'HPLC rappresenta l'unico possibile metodo di conferma delle tecniche RIA.

Recentemente Pudill (37) ha proposto una separazione HPLC accoppiata a FAB-MS: mancano tuttora dati certi sulla sensibilità e riproducibilità di questa tecnica, peraltro estremamente interessante.

### BIBLIOGRAFIA

1. BORNET A., PASI A. & HARTMANN H. P., 1983 - *Rev. Med. Suisse Romande*, 103: 447.
2. Editorial, *Lancet*, ii (1980) 351.
3. BRESINSKY A. & BESL H., 1985, in, A colour atlas of poisoning fungi. *Wolfe Publishing Ltd.*, London, p. 2.
4. OLSON K. R., POND S. M., SEWARD J., HEALEY K., WOO O. F. & BECKER C. E., 1982 - *West J. Med.*, 137, 282.
5. FLOERSHEIM G. L., WEBER O., TSCHUMI P. T. & ULBRICH M., 1982 - *Schweiz Med. Wochenschr.*, 112: 1177.
6. HOMANN J., RAWER P., BLEYL H., MATTHES K.-J. & HEINRICH D., 1986 - *Arch. Toxicol.*, 59: 190.
7. FAULSTICH H., KOMMERELL B., BLEYL H. & WIELAND TH (Editors), 1980 - *Amanita Toxins and Poisoning*. Verlag Gerhard Witzstrock, Baden Baden.
8. WIELAND TH., 1986 - *Peptides of poisonous amanita mushrooms*. Springer Verlag, New York, p. 14.
9. WOODLE E. S., MOODY R. R., COX K. L., CANNON R. A. & WARD R. E., 1985 - *J.A.M.A.*, 253: 69.
10. BOUDJEMA K., WOLF P., BURTSCHER A., JUIF J. G., STEIB A., ELLERO B., JAECK D. & CINQUALBRE J., 1989 - *Presse Med.*, 18: 937.
11. BOHERINGER W., 1959 - Thesis. *Universitat Frankfurt a.M.*
12. CESSI C. & FIUME L., 1969 - *Toxicon*, 6: 309.
13. FAULTSTICH H. - Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 354 (1973), 1395.
14. FIUME L., BUSI C., CAMPADELLI-FIUME G. & FRANCESCHI C., 1975 - *Experientia*, 31: 1233.
15. BUSI C., FIUME L. & COSTANTINO D., in FAULTSTICH H., KOMMERELL B. & WIELAND TH. (Editors), 1980 - *Amanita Toxins and Poisoning*. Verlag Gerhard Witzstrock, Baden Baden, p. 43.
16. FAULTSTICH H., TRISCHMANN H. & ZOBEL S., 1975 - *FEBS Letters*. 56: 312.
17. FAULTSTICH H., ZOBEL S. & TRISCHMANN H., 1982 - *Toxicon*. 20: 913.
18. ANDRES R. Y., FREI W., GAUTSCHI K. & VONDERSCHMITT D. J., 1986 - *Clin. Chem.*, 32: 1751.
19. KIRCHNER K. & FAULTSTICH H., 1986 - *Toxicon*, 24: 273.
20. ZHELEV ZH. D., HALACHEVA K. S., ZHELEVA A. M. & ALEXIEV CH. I., 1987 - *Compt. rend. Acad. bulg. Sci.*, 40: 81.

21. WIELAND TH., SCHMIDT G. & WIRTH L., 1952 - *Liebigs. Ann Chem.*, 577: 215.
22. WIELAND TH. & BOEHRINGER W., 1960 - *Liebigs. Ann Chem.*, 635: 178.
23. PALYZA V. - *J. Chromatogr.*, 64 (172): 317.
24. ANDARY C., ENJALBERT F., PRIVAT G. & MANDROU B., 1977 - *J. Chromatogr.*, 132: 525.
25. FAULSTICH H., GEORGPOLOUS D., BLOCHING M. & WIELAND TH., 1973 - *J. Chromatogr.*, 79: 257.
26. STIJVE T. & SEEGER R., 1979 - *Z. Naturforsch.*, 34c: 1133.
27. STIJVE T. in FAULSTICH H., KOMMERELL B. & WIELAND TH. (Editors), 1980 - *Amanita Toxins and Poisoning. Verlag Gerhard Witzstroek*, Baden Baden, p. 30.
28. CACCIALANZA G., GANDINI C. & PONCI R., 1985 - *J. Pharmacol. Biomed. Anal.*, 3: 179.
29. PASTORELLO L., TOLENTINO D., D'ALTERIO M., PALADINO R., FRIGERIO A., BERGAMO N. & VALLI A., 1982 - *J. Chromatogr.*, 233: 398.
30. BELLIARDO F. & MASSANO G., 1983 - *J. Liq. Chromatogr.*, 6: 551.
31. JEHEL F., GALLION C., BIRCKEL P., JAEGER A., FLESCH F. & MINCK R., 1985 - *Anal. Biochem.*, 149: 35.
32. FENOIL R., ALFIERI R. & WEISZ G. in PIEMONTE G., TAGLIARO F., FRIGERIO A. & MARIGO M. (Editors), 1987 - *Developments in Analytical Methods in Pharmaceuticals, Biomedical, and Forensic Sciences. Plenum Press*, New York, p. 143.
33. RIECK W. & PLATT D., 1988 - *J. Chromatogr.*, 425: 121.
34. TAGLIARO F., CHIMINAZZO S., MASCHIO S., ALBERTON F. & MARIGO M., 1987 - *Chromatographia*, 24: 482.
35. TAGLIARO F., SCHIAVON G., BONTEMPELLI G., CARLI G. & MARIGO M., 1991 - *J. Chromatogr.*, 563: 299.
36. FINKLE B. S., 1987 - *Clin. Chem.*, 33, 138.
37. PUDILL R., 1989 - *GIT Labor-Medizin*, 7: 320.

---

Indirizzo degli autori:

S. Moretto - F. Tagliaro - M. Marigo:

Istituto di Medicina Legale e delle Assicurazioni dell'Università di Verona - Verona

R. Dorizzi - Laboratorio di Chimica Clinica dell'Ospedale di Legnago - Verona

D. Michelot - Laboratorio di Chimica Applicata del Museo Nazionale di Storia naturale - Parigi