



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina – DIMED

Corso di Laurea in

Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente: Chiarissimo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA

DETERMINAZIONE DI ALFA- E BETA-AMANITINE NEI CASI
DI INTOSSICAZIONE DA FUNGHI

Relatore: Prof.ssa Donata Favretto

Correlatore: Anna Pagliaro

Laureanda: Martina Latoszek

Matricola 1200389

ABSTRACT

Introduzione. I casi di intossicazione da funghi epatotossici sono molto spesso letali. Data la larga diffusione di *Amanita phalloides*, la specie principalmente responsabile, è fondamentale una diagnosi precoce e inequivocabile di avvelenamento per iniziare la terapia farmacologica – che prevede la somministrazione di silibinina e penicillina – e quindi migliorare la prognosi del paziente. Nei casi più severi può essere necessario un trattamento più invasivo, come il trapianto di fegato, unito all'emodialisi se c'è coinvolgimento del parenchima renale. Lo scopo della tesi era la messa a punto di un metodo per la diagnosi di intossicazione da Funghi.

Materiali e metodi. Sono stati utilizzati due metodi, che prevedono due procedure diverse: SPE con cartucce Bond Elut C18 (Agilent) e SPE con cartucce Oasis MCX (Waters) preceduta da LLE. Gli estratti di plasma e urina (1.2 ml) e dei calibratori in matrice blank sono stati fatti evaporare sotto flusso di azoto e ricostituiti con 150 µl di soluzione (acqua 0.1% acido formico/metanolo 90/10). Infine sono stati analizzati con UPLC-MS/MS a triplo quadrupolo (Xevo TQ-S micro, Waters) utilizzando una ionizzazione positiva (ESI+). Si sono ottenuti tracciati cromatografici ben risolti.

Risultati. Il secondo metodo ha un recupero migliore ed una maggiore linearità di segnale rispetto al primo. Il limite di quantificazione (LOQ) è 25 ng/ml.

Conclusioni. La procedura di estrazione è stata ottimizzata, ma risulta lunga ed indaginosa, oltre a richiedere un quantitativo considerevole di campione. Sarà necessario aumentare la sensibilità per evidenziare livelli di amanitina <25 ng/ml.

INDICE

1. INTRODUZIONE	pg. 1
1.1 Amanitine	pg. 1
1.1.1 Meccanismo d'azione	pg. 2
1.1.2 Tossicologia	pg. 2
1.1.3 Trasmissione	pg. 3
1.1.4 Terapia	pg. 4
2. <i>AMANITA PHALLOIDES</i>	pg. 5
2.1 Descrizione	pg. 5
2.2 Distribuzione	pg. 6
2.3 Tossicità	pg. 6
2.4 Dose Letale 50 (DL ₅₀)	pg. 6
3. MATRICI BIOLOGICHE ANALIZZATE	pg. 7
3.1 Matrice ematica	pg. 7
3.2 Matrice urinaria	pg. 7
4. DETERMINAZIONE DI XENOBIOTICI: TECNICHE UTILIZZATE	pg. 9
4.1 Estrazione liquido-liquido (LLE)	pg. 9
4.2 Estrazione in fase solida (SPE)	pg. 9
4.3 Cromatografia	pg. 10
4.2.1 HPLC	pg. 12
4.4 Spettrometria di massa (MS)	pg. 13
4.3.1 Analizzatore a triplo quadrupolo	pg. 15
5. SCOPO DELLO STUDIO	pg. 17
6. MATERIALI E METODI	pg. 18
6.1 Preparazione dei campioni	pg. 18
6.1.1 Reagenti	pg. 18
6.1.2 Strumentazione	pg. 18
6.1.3 Preparazione della curva di calibrazione – metodo 1	pg. 19
6.1.4 Preparazione dei campioni – metodo 1	pg. 20
6.1.5 Preparazione della curva di calibrazione – metodo 2	pg. 23
6.1.6 Preparazione dei campioni – metodo 2	pg. 23
6.2 Analisi dei campioni – UPLC-MS/MS	pg. 25
7. RISULTATI	pg. 26
7.1 Applicazione a casi reali	pg. 32

8. <u>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</u>	<u>pg. 33</u>
9. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>pg. 34</u>
10. <u>RINGRAZIAMENTI</u>	<u>pg. 35</u>

INTRODUZIONE

Amanitine

Le amanitine, altresì conosciute come amatossine, sono un gruppo di composti tossici riscontrati in alcune specie fungine, quali *Amanita phalloides*, *Amanita virosa* – pari alla prima per pericolosità – ed altre.

Sono state isolate nove molecole, a cui sono stati dati dei nomi propri (è il caso dell'Amanina e dell'Amanullina) o indicate con le lettere dell'alfabeto greco a costituire il prefisso: α -amanitina, β -amanitina e via dicendo ¹.

Sono ciclopeptidi solubili in etanolo, metanolo e acqua; inoltre sono resistenti ad alte temperature, all'essiccazione, al congelamento e al pH dei succhi gastrici: ciò le rende impossibili da inattivare e letali nella maggior parte dei casi.

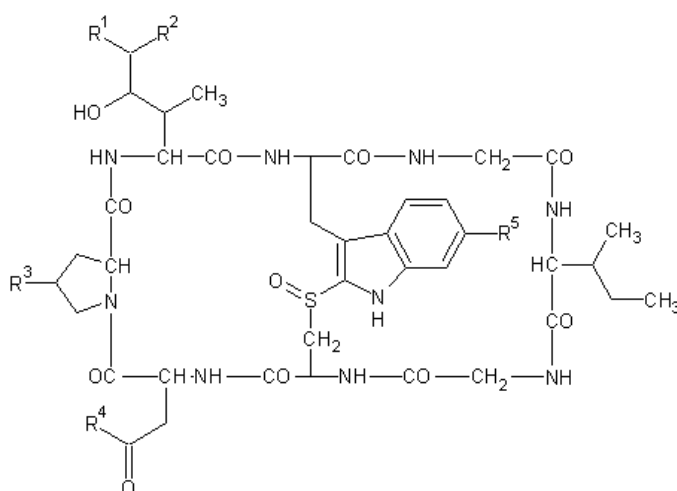


Figura 1: Formula chimica generale delle amanitine.

L'intossicazione di cui sono responsabili viene chiamata "sindrome falloidea", dal nome della specie coinvolta più frequentemente.

Le due micotossine che verranno prese in considerazione in questo studio, l' α -amanitina e la β -amanitina, presentano gli stessi gruppi funzionali: -CH₂OH a livello di R¹ e tre ossidrilici (-OH) in R², R³ ed R⁵. Si differenziano invece a livello di R⁴: la prima presenta un gruppo amminico (-NH₂), mentre la seconda presenta un ulteriore ossidrile.

Meccanismo d'azione

Mentre le falloidine, altre tossine presenti in *A. phalloides*, legano l'actina e causano una fuoriuscita di ioni sodio fino alla lisi della cellula, le amanitine, in particolare di tipo α e β , agiscono attraverso la formazione di un complesso con le RNA polimerasi, in particolare la II, inibendole ¹. L'avvelenamento da α -amanitina, infatti, causa una riduzione progressiva del contenuto di RNA cellulare durante le prime 24 ore.

Questa elevata sensibilità delle polimerasi è stata riscontrata nei mammiferi, mentre altri organismi hanno mostrato minor reattività; i funghi, ad esempio, sono risultati fino a 50 volte meno suscettibili ¹.

Tossicologia

Le amatossine quindi interferiscono con i processi di sintesi proteica, causando una deplezione progressiva delle proteine cellulari – oltre a frammentazione delle componenti nucleolari e condensazione della cromatina – e necrosi diffusa.

La sindrome falloidea consta di quattro fasi:

- *fase di latenza*, va in media dalle 8 alle 10 ore dal pasto (sebbene possa arrivare fino a 36 ore) e risulta in genere priva di sintomi per il paziente poiché si ha l'incubazione delle tossine nell'organismo ¹. Queste, infatti, agiscono dal lato vascolare delle cellule enteriche dopo averle raggiunte tramite torrente circolatorio, non direttamente dal lume dell'organo;
- *fase coleriforme* (o gastrointestinale), in cui compare una sintomatologia improvvisa comprendente dolori addominali, vomito e diarrea, insieme ad anuria, arsuria e sudorazione. I test biochimici tuttavia risultano ancora normali e non si ha segno di tossicità epatica. È la disidratazione quindi, non le tossine, a portare il paziente ad una condizione di ipovolemia con conseguente insufficienza prerenale ², in mancanza di trattamento, fino a shock ipovolemico e decesso. Se il soggetto viene adeguatamente reidratato, il malfunzionamento renale è reversibile ²;
- *fase epatica*, insorge a circa 36 ore dall'ingestione e può essere caratterizzata da un miglioramento delle condizioni del soggetto, ma in genere seguono insonnia e prostrazione per i dolori causati dai danni progressivi e irreversibili a livello epatico, renale e muscolare. Nel 50 fino al 90% dei casi si ha la morte del paziente

in circa 48 ore, in caso contrario si presenta un quadro di aumento delle transaminasi (biomarcatori di necrosi epatica), della bilirubinemia e dell'ammoniemia, oltre ad un calo dell'attività protrombinica e della glicemia;

- *fase di insufficienza epatica grave*, si ha dopo 4-5 giorni ed è accompagnata da un calo drastico dei livelli di fattore V della coagulazione e di protrombina, oltre che da una riduzione delle transaminasi da epatonecrosi massiva – in opposizione ad un aumento dell'urea e della creatinina (biomarkers di danno renale). La sintomatologia di questo stadio comprende emorragie interne, crisi di tipo respiratorio e convulsioni, ma anche insufficienza renale acuta, coagulopatia e coma epatico.

In caso di decesso, che può avvenire fino a 16 giorni dall'ingestione, all'esame autoptico si riscontrano quindi steatosi epatica con focolai di necrosi centrolobulare, accompagnata da necrosi anche a livello renale.

Per quanto riguarda invece gli effetti che può avere l'etanolo nei casi di intossicazione da *Amanita*, i risultati sono discordanti: da una parte si è visto come questa sostanza, attraverso la perossidazione dei lipidi, porterebbe ad un minor assorbimento delle tossine ³; dall'altra l'alcol etilico non avrebbe alcun effetto citoprotettivo, ma al contrario causerebbe un peggioramento nel decorso e nella prognosi ⁴.

Trasmissione

Un caso ha dimostrato come, sebbene il siero di una paziente all'ottavo mese di gravidanza fosse positivo per α -amanitina (18.5 ng/ml con HPLC) in seguito ad avvelenamento (*A. phalloides*), il liquido amniotico fosse risultato privo di tossine; dopo il trattamento la donna ha partorito un neonato sano ⁵, a dimostrazione del fatto che le amanitine non attraversano la barriera placentare.

In un altro caso è stato constatato come una 26enne, nonostante l'avvelenamento da *Amanita*, abbia dato alla luce un figlio senza alcun segno di danno epatico ⁶. Non si avrebbe quindi trasmissione verticale in seguito ad intossicazione.

Ad ogni modo se la madre risulta gravemente intossicata è opportuno considerare il feto come soggetto a rischio, dal momento che in un caso di severa intossicazione di una donna al primo trimestre di gravidanza in cui è stato indotto l'aborto, il fegato fetale è risultato danneggiato in modo compatibile con lesione da amatossine ⁷.

Terapia

Ad oggi la terapia prevista in caso di avvelenamento acuto da *A. phalloides* comprende la stabilizzazione del paziente con correzione dell'ipoglicemia e dello squilibrio elettrolitico, la decontaminazione – che consiste nella lavanda gastrica e nella somministrazione di carbone attivo – e la somministrazione di farmaci ⁸ che vadano ad inibire l'incorporazione della tossina negli epatociti del paziente: silibinina e penicillina sono i più utilizzati, ma spesso è necessario un trattamento più invasivo quale il trapianto di fegato. Se il soggetto presenta anche danni renali dovrà sottoporsi all'emodialisi.

La collaborazione del paziente, nel caso in cui sia possibile, è fondamentale: la diuresi forzata infatti può risultare molto utile, dal momento che la via di eliminazione più importante è quella renale. Si è visto come nel cane l'80% della dose di amatossine venga escreta nelle urine entro 6 ore ⁹. Risultati sperimentali inoltre hanno mostrato come la concentrazione urinaria di tossine calasse drasticamente fino ad azzerarsi entro 24-36 ore dall'ingestione del fungo ¹⁰.

AMANITA PHALLOIDES

Considerato il fungo più pericoloso in natura, è caratterizzato da un tasso di tossicità notevolmente elevato e da un polimorfismo tale per cui somiglia a molte specie, sia congeneri che non.

Questo basidiomicete è conosciuto anche come ti-gnosa verdognola o col nome comune di “angelo della morte” ed appartiene alla famiglia delle Amanitaceae, di cui fa parte anche la più nota *Amanita muscaria*, specie caratterizzata sia da tossine, sia da effetti psicoattivi.



Figura 2: *A. phalloides*.

Descrizione

- Cappello: di forma conico-campanulata e liscio, pianeggiante, privo di verruche e dal colore variabile – da verdastro a grigio tendente al giallo, a bianca nella varietà *alba*.
- Lamelle: bianche e libere al gambo.
- Gambo: bulboso alla base e pieno nell’esemplare giovane, di colore bianco con striature, generalmente del colore del cappello.

Queste tre parti appena descritte vanno a costituire il “carpoforo”, ossia il corpo fruttifero del fungo.

- Anello: bianco-giallognolo, spesso caduco nella fase adulta del fungo.
- Carne: bianca, soda; il sapore, se presente, può ricordare quello delle nocciole. L’odore invece varia in base alle condizioni dell’esemplare: prima nullo, poi ricorderebbe il miele, man mano che il fungo cresce, e “cadaverico” nel fungo fradicio.
- Spore: bianche, di forma ovoidale o rotonda.

Distribuzione

Diffusa in tutta Europa, l'*A. phalloides* predilige i boschi di latifoglie, perlopiù querce e castagni, ma cresce anche nei prati e nei pressi di coltivazioni. Dai dati pubblicati sulla distribuzione e sui casi di avvelenamento, tuttavia, è presente anche in America, Sud Africa, Australia ed India ¹.

Tossicità

Questa specie è la causa, a livello globale, della maggior parte degli avvelenamenti con conseguenze letali: come già citato in precedenza, la termostabilità delle amanitine consente loro di non perdere le proprie caratteristiche in seguito alla cottura del fungo.

Le tossine non sono distribuite uniformemente nelle componenti del fungo, presentando infatti differenze sostanziali: il cappello, le lamelle e l'anello contengono una maggior concentrazione di amatossine – 6.47 mg/g, contro i 0.253 mg/g del bulbo, in cui prevalgono le fallotossine. Inoltre la loro concentrazione aumenta mano a mano che l'esemplare si sviluppa ¹¹ ed è maggiore negli esemplari europei rispetto a quelli nordamericani.

Dose letale 50 (DL₅₀)

Detta anche "LD₅₀", ovvero "Lethal Dose 50" in inglese, è il termine tossicologico per indicare la dose di una qualsiasi sostanza che, in seguito a singola somministrazione, riesce ad uccidere la metà di una popolazione campione. Si utilizza quindi per verificare il potenziale di tossicità acuta, ovvero a breve termine, e si esprime in milligrammi di principio attivo somministrato per chilogrammi di peso dell'animale utilizzato come campione (mg/kg).

Nel caso della α -amanitina e della β -amanitina la DL₅₀ corrisponde rispettivamente a 0.3 e 0.5 mg/kg nel topo, per somministrazione intraperitoneale ¹²: un valore molto basso se confrontato con quello della caffeina, che equivale a 192 mg/kg nel topo. Anche quantità esigue di *A. phalloides* quindi possono portare al decesso, si parla infatti di circa un grammo di peso fresco per chilogrammo di peso corporeo.

MATRICI BIOLOGICHE ANALIZZATE

In questo elaborato di tesi verranno approfondite solo le matrici biologiche prese in considerazione per la realizzazione dello studio, ossia il plasma e l'urina.

Matrice ematica

Il sangue rappresenta la matrice di elezione per gli esami di laboratorio, anche in ambito tossicologico. Pur essendo il prelievo una procedura invasiva e soggetta a rischi, questa matrice è correlabile allo status psico-fisico del soggetto e quindi ad un eventuale condizione di *impairment*, ovvero di inabilitazione o alterazione. Permette perciò di valutare un'esposizione molto recente alle sostanze, che possono permanere più o meno a lungo nel torrente circolatorio e subire le prime modificazioni da parte del fegato. In questa matrice infatti i metaboliti sono generalmente presenti in maggior quantità rispetto al principio attivo, che è comunque facilmente rilevabile. Si può conservare a +4 °C o a temperature inferiori; tuttavia se l'analisi va eseguita su siero o plasma, sarebbe meglio congelare solo la quantità necessaria e conservare in frigorifero un'aliquota di sangue intero, che se congelato può dare emolisi e/o coaguli, falsando i risultati dell'analisi.

Per la ricerca di amanitine si utilizza il plasma, che rappresenta la parte liquida del sangue, ovvero circa il 55%, ed è composto da acqua, proteine, molecole organiche, ioni, sostanze gassose e vitamine. Si ottiene da sangue intero unito ad anticoagulante e poi centrifugato.

Matrice urinaria

Costituisce il prodotto dell'ultrafiltrazione del sangue da parte dei reni e accompagna spesso il prelievo di sangue, dal momento che consente la rilevazione di sostanze assunte recentemente e che la finestra temporale in questo caso è più ampia: le molecole permangono nell'urina per più tempo rispetto a quanto avviene nella matrice ematica. La procedura di raccolta non è invasiva, ciò favorisce la possibilità di ottenere anche grandi volumi di campione, sufficienti sia per le analisi di screening sia per quelle eventuali di conferma; i metaboliti sono presenti in quantità molto maggiori rispetto alla molecola precursore, comunque presente.

La conservazione del campione di urina è semplice, i fattori che entrano in gioco al momento dell'analisi, però, sono molteplici: la concentrazione della sostanza riscontrata nel campione varia in base alla dose e alla modalità di assunzione, all'intervallo di tempo esposizione-raccolta e all'elevata alterabilità per diluizione, sia *in vivo* sia dopo il prelievo. Per questo non dà esiti con valore forense, dal momento che non si ha una correlazione tra lo status psico-fisico del paziente al momento del prelievo e la sostanza assunta.

DETERMINAZIONE DI XENOBIOTICI: TECNICHE UTILIZZATE

Estrazione liquido-liquido (LLE)

Questa tecnica di estrazione, indicata con questo acronimo dall'inglese "Liquid-Liquid Extraction", ed ha come fine il passaggio di un soluto da un solvente ad un altro con differente polarità e solubilità.

Quando i due liquidi vengono inseriti nell'imbuto separatore, grazie all'agitazione si ha una separazione tra due fasi: una acquosa ed una organica.

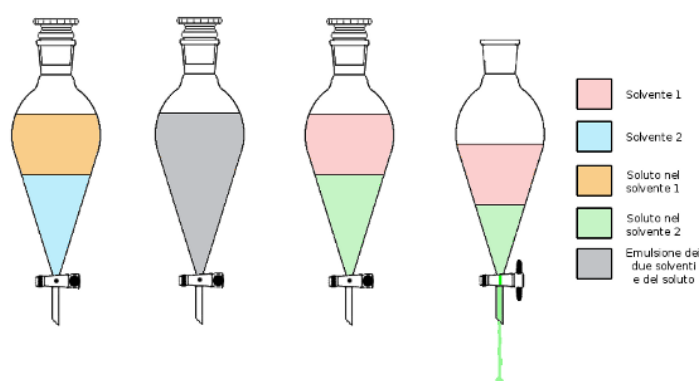


Figura 3: Steps per estrazione liquido-liquido.

In questo caso il diclorometano, solvente organico più denso dell'acqua, si ritroverà sul fondo della provetta; la fase acquosa invece andrà a costituire il soprannatante e verrà prelevato per proseguire l'analisi.

Estrazione in fase solida (SPE)

L'acronimo deriva dall'inglese "Solid-Phase Extraction" e con questa sigla si indica una tecnica di estrazione che si basa sull'affinità delle sostanze presenti in una matrice per una sostanza, solitamente impaccata in colonnine, che costituisce la fase solida; questa viene scelta in base alla struttura e alla polarità dell'analita da ricercare. Le sostanze presenti in fasi diverse interagiscono attraverso interazioni di tipo chimico o elettrostatico. In questo modo si può purificare il campione eliminando le molecole interferenti, concentrando così l'analita in esame. I passaggi sono mostrati in Figura 4.

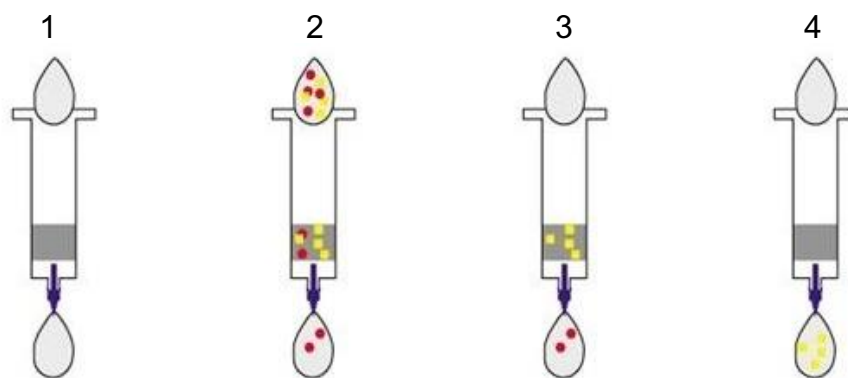


Figura 4: Steps per estrazione in fase solida.

Per prima cosa si effettua un *condizionamento* della colonnina (1), fondamentale per rimuovere l'aria intrappolata nella fase fissa e per attivare i "ligandi": così facendo aumenterà il numero di interazioni tra le molecole nei passaggi successivi. Successivamente si procede con il caricamento dei campioni (2): la fase fissa si riempie, raccogliendo sia gli analiti d'interesse sia le particelle interferenti, che restano intrappolate nella colonnina; è cruciale che questo passaggio venga eseguito con delicatezza, senza forzare il flusso, in modo da non far fluire le molecole da analizzare nello scarico. In questo step alcune molecole inquinanti riescono già ad attraversare il sistema.

Si continua con il lavaggio (3), che permette di far defluire tutte le molecole interferenti senza interagire con l'analita, che permane all'interno della fase fissa. Infine, attraverso l'eluizione (4), mediante una sostanza chiamata appunto "eluente" si ha il rilascio delle particelle target: ciò è possibile grazie alla maggiore affinità dell'eluente per l'analita rispetto alla fase fissa. Per massimizzare la quantità di molecole interagenti con l'eluente, e quindi la concentrazione delle molecole all'interno della soluzione, è importante che anche questo passaggio venga compiuto delicatamente.

Cromatografia

Metodo analitico per la separazione delle componenti di una miscela, la cromatografia sfrutta la diversa affinità delle sostanze chimiche per una fase, detta "stazionaria" o "fissa", oppure per l'altra, definita "mobile". La prima può essere costituita da un solido, un liquido (fissata comunque ad un supporto solido) o un gel, ed in seguito distribuita su un film o impaccata in una colonna; la seconda, invece, è generalmente liquida o gassosa e migra attraverso la fase fissa con, al suo interno, le sostanze ricercate.

Le due fasi sono tra loro immiscibili e, in base alle caratteristiche degli analiti, si può scegliere il metodo più adatto: per le sostanze volatili si utilizza una gascromatografia (GC), al contrario per quelle non volatili si predilige la cromatografia liquida (LC).

In base all'affinità del soluto per la fase stazionaria, ad esempio, il soluto impiegherà più o meno tempo per attraversarla: più la molecola è affine, più sarà trattenuta, e più tempo sarà necessario affinché la percorra. La fase mobile poi ha una certa capacità di competere con la forza di ritenzione esercitata dalla fase fissa, e questo determina la velocità relativa di migrazione; nonostante gli analiti presenti nel campione entrino contemporaneamente nella colonna, ne usciranno uno alla volta ¹³.

Alla fine del sistema è sempre presente un rivelatore che, producendo tanti segnali specifici quante sono le molecole, raccoglie i dati e li elabora in un grafico detto *cromatogramma*: questo mette in relazione l'intensità di segnale (asse delle ordinate) e il tempo (in ascissa); i profili ottenuti nel grafico, a forma di picco, hanno un'area direttamente proporzionale alla quantità di sostanza iniettata, mentre il tempo coincidente con il punto più alto del picco corrisponde al tempo impiegato dal soluto per percorrere la colonna e passare davanti al rivelatore. Questo parametro viene chiamato "tempo di ritenzione" – t_R , o RT "retention time" ed è direttamente proporzionale al valore K, ossia il coefficiente di distribuzione tra le due fasi del sistema, corrispondente al rapporto tra la concentrazione di soluto nella fase stazionaria e in quella mobile, basato sull'equilibrio di ogni specie chimica tra le due fasi e indipendente dalla concentrazione.

$$K = \frac{\text{concentrazione soluto in fase fissa}}{\text{concentrazione soluto in fase mobile}}$$

Per valutare la qualità di separazione degli analiti da parte del sistema cromatografico ci si affida ad alcuni parametri dipendenti dalla risoluzione, ossia la capacità di discriminare due sostanze con RT molto vicini, fondamentale per identificare e quantificare correttamente due o più molecole. Questa dipende da molteplici fattori:

- la selettività (α) definisce l'abilità del sistema di eluire due molecole diverse con velocità più diverse possibile, tiene conto delle "K";
- l'efficienza (N) descrive la capacità del sistema di restituire dei picchi stretti, segno di maggiore qualità nella separazione delle specie chimiche;
- il fattore di capacità (k') indica l'affinità dell'analita per la fase fissa, è un valore indipendente dalla velocità del flusso della fase mobile e dalla lunghezza della

colonna; tiene conto del tempo morto, ossia il tempo necessario per attraversare gli spazi vuoti della fase stazionaria.

HPLC

È un acronimo per “High Performance Liquid Chromatography” e sta ad indicare un tipo di cromatografia liquida in cui vengono sfruttate pressioni elevate – vengono raggiunte anche le 1000 atmosfere – e la fase stazionaria è solida, impaccata in una colonna, mentre quella mobile è liquida e fluisce attraverso essa.

Questa tecnica consente di effettuare analisi sia qualitative sia quantitative, di sostanze polari, apolari e ioniche, anche termicamente instabili o non volatili.

Nonostante i costi molto più elevati rispetto ad un sistema LC tradizionale, questa tecnica presenta svariati vantaggi, tra cui:

- una dimensione ridotta della colonna che evita movimenti longitudinali della fase mobile;
- velocità di eluizione (passaggio della fase mobile attraverso la colonna) regolabile e costante;
- maggior velocità di esecuzione dell'analisi;
- volumi di campione ridotti – nell'ordine dei 5-10 microgrammi di campione solubilizzato – recuperabili al completamento della corsa;
- alta sensibilità e risoluzione, per la separazione di molecole simili tra loro.

Naturalmente si tratta di un sistema molto delicato, all'interno del quale anche la presenza di polvere o di bolle (a livello del solvente) può causare interferenze non irrilevanti a livello del rivelatore.

Le pompe, componenti chiave del sistema idraulico, sono resistenti alla corrosione e, oltre alla già citata capacità di generare pressioni notevoli, devono garantire la precisione del flusso con cui la fase mobile fluisce attraverso la colonna e oltrepassa il rivelatore.

Le colonne sono solitamente in acciaio inossidabile con diametri e lunghezze che possono differire, così come la fase fissa può essere costituita da particelle a base di silice di tipi e dimensioni diverse. Se queste ultime sono inferiori aumenta l'efficienza della colonna, parametro direttamente proporzionale anche alla lunghezza della stessa.

È comunque opportuno ricordare che non è possibile incrementare questi valori oltre una data soglia, dal momento che le pressioni esercitate perché la fase mobile attraversi la colonna sarebbero troppo elevate.

Nella U(H)PLC – Ultra (High) Performance Liquid Chromatography – le pressioni di esercizio raggiungono livelli più alti rispetto alla HPLC classica, ed è presente una colonnina di guardia prima della colonna analitica, al fine di impedire il passaggio di impurità o materiale particolato. Questa tecnica presenta vantaggi non indifferenti: tempo di analisi ridotto, maggiore efficienza e risoluzione, e minor volume di campione necessario; oltre a ciò si ha un'ulteriore riduzione delle dimensioni delle particelle costituenti la fase fissa, che arrivano ad un diametro inferiore ai 3 μm . Purtroppo queste condizioni non sono ottimali per la vita delle colonne, che si riduce drasticamente.

Spettrometria di massa (MS)

La spettrometria di massa, “Mass Spectrometry” in inglese, è una tecnica analitica utilizzata in molti ambiti di laboratorio basata sul principio per cui gli ioni sono sensibili a forze prodotte da campi elettrici, magnetici e da radiofrequenze, che fanno accelerare, decelerare e cambiare traiettoria alle particelle cariche elettricamente.

Ciò consente l'identificazione di sostanze incognite, la determinazione quantitativa di composti noti e comprendere proprietà chimiche e strutturali di alcune molecole.

A differenza di altre tecniche questa prevede una procedura distruttiva, poiché dopo l'analisi il campione viene frammentato irreversibilmente; tra i vantaggi presenta alta selettività, specificità e sensibilità, oltre a necessitare di una quantità quasi irrisoria di campione, in cui la concentrazione dell'analita può essere minima.

Lo strumento, lo spettrometro di massa, consente di misurare indirettamente la massa di una molecola attraverso la determinazione del rapporto massa/carica (m/z) degli ioni *daughters*, formati in seguito alla ionizzazione della molecola iniziale, o *parent*. L'unità di misura utilizzata è il Dalton (Da), corrispondente a 1/12 della massa di un atomo di ^{12}C .

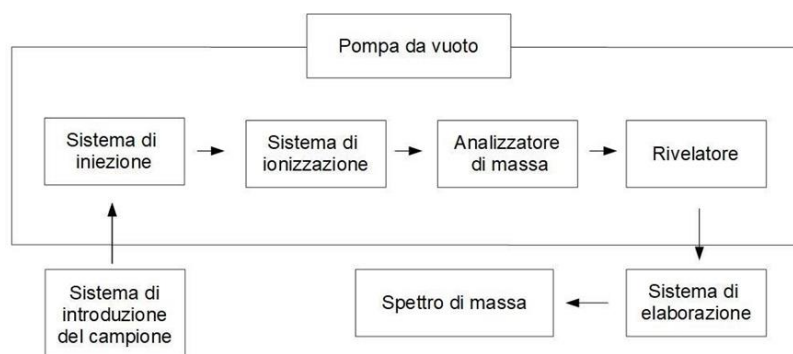


Figura 5: Schema di uno spettrometro di massa.

Al fine di permettere il flusso degli ioni e perché questi non collidano con i gas atmosferici, è all'interno di una camera da vuoto che avvengono i tre processi principali – ovvero la produzione di ioni e la loro frammentazione nella sorgente di ionizzazione, la separazione di questi nell'analizzatore di massa e la rivelazione. In quest'ultima fase viene misurata la quantità di ioni che emerge dall'analizzatore, attraverso la conversione in energia elettrica.

Il campione uscente dal sistema UPLC viene iniettato nella sorgente di ionizzazione: qui sono prodotti gli ioni gassosi dell'analita, che verranno analizzati successivamente. Esistono svariati tipi di sorgenti di ionizzazione, ma per lo svolgimento di questo studio è stato sfruttato un sistema di ionizzazione per elettrospray (ES o ESI, *Electrospray Ionization*), che consente di produrre ioni gassosi a partire da una soluzione liquida. Infatti è con questo processo che comincia la produzione degli ioni: il campione viene fatto passare per un capillare, a cui viene applicata una differenza di potenziale positiva o negativa tra i 2 e i 5 KV. In questo modo si genera un campo elettrico che comporta un accumulo di cariche sulla superficie del liquido in uscita dal capillare: queste sono sufficientemente elevate da superare la tensione superficiale del liquido, si formano così delle goccioline elettricamente cariche; il segno della carica dipende da quello del voltaggio applicato al capillare.

In seguito il solvente all'interno delle goccioline viene fatto evaporare con un flusso di azoto riscaldato, esse si contraggono e la densità di carica aumenta; nel momento in cui le forze di repulsione tra gli ioni sulla superficie superano l'effetto di coesione dato dalle tensioni superficiali, la gocciolina esplose portando alla formazione di molte altre goccioline cariche di dimensioni ancora inferiori.

Gli ioni così prodotti vengono immessi nell'analizzatore di massa. Questa componente dello strumento separa gli ioni provenienti dalla sorgente ionica in base al loro rapporto m/z ; l'analizzatore inoltre deve avere una buona trasmissione ionica – deve essere in grado di far giungere al rivelatore tutti gli ioni di interesse – e una buona risoluzione di massa, per separare due ioni con masse vicine.

Il filtro di massa a singolo quadrupolo ha apportato svariati vantaggi nell'ambito della spettrometria di massa: ha consentito una riduzione dell'ingombro strumentale nonché dei tempi necessari per l'analisi, insieme ad un'augmentata accessibilità sia dal punto di vista dell'utilizzo sia da quello economico ¹⁴.

Un quadrupolo è costituito da quattro elettrodi a barra, di forma cilindrica o iperbolica, che si estendono sulla direzione z e sono montati in una configurazione a quadrato. Le coppie di barre opposte sono mantenute ognuna allo stesso potenziale, una con corrente continua ed una con corrente alternata. Quando uno ione entra nel sistema quadrupolare in direzione z , esso subisce una forza attrattiva verso le barre con polarità opposta.

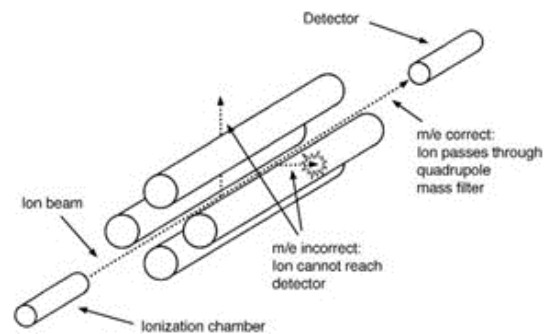


Figura 6: Schema di un quadrupolo.

Lo ione attraversa il canale tra le barre e nel caso in cui ne colpisca una, esso viene neutralizzato; ciò avviene più facilmente con frequenze basse o ioni leggeri, questo perché a parità di energia cinetica gli ioni leggeri cambiano traiettoria più velocemente rispetto quelli più pesanti. Se la particella carica riesce ad uscire dal quadrupolo entra nel sistema rivelatore. Impostando appropriate scansioni di frequenza di oscillazione del campo è possibile far uscire gli ioni in ordine crescente per massa molecolare.

Il moto degli ioni nel quadrupolo dipende dal loro rapporto m/z , dalle dimensioni del quadrupolo stesso e dall'intensità del potenziale dei campi elettrici continui.

Analizzatore a triplo quadrupolo

L'analizzatore all'interno dello strumento utilizzato per realizzare questo studio presenta tre quadrupoli (Xevo TQ-S micro): all'interno del primo lo ione viene separato e nel terzo si svolge l'analisi su m/z ; il secondo quadrupolo, invece, rappresenta la cella di collisione. Questo viene riempito di gas inerte (argon o azoto) e ad esso viene applicata una radiofrequenza al fine di mantenere focalizzati gli ioni generati dalla rottura della molecola parent.

Infine, gli ioni uscenti dall'analizzatore generano una corrente ionica a livello del rivelatore, all'interno del quale il segnale analogico viene convertito in segnale digitale ed i dati ottenuti vengono elaborati per ottenere lo spettro di massa.

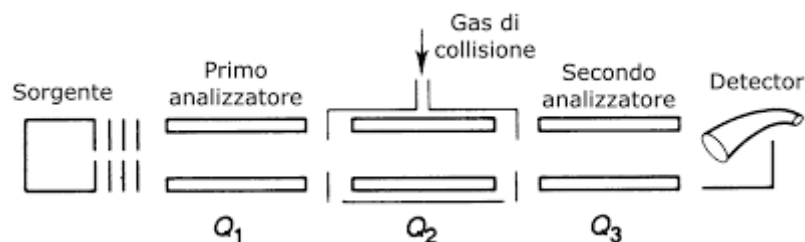


Figura 7: Schema di un spettrometro di massa a triplo quadrupolo.

È possibile ottenere lo spettro di massa con tre diverse modalità:

- FULL SCAN MS: tutte le masse trovate all'interno di un intervallo – stabilito dall'operatore – vengono trasmesse al rivelatore, ciò consente di riconoscere il maggior numero possibile di sostanze presenti nel campione. Il risultato è il TIC (Total Ion Chromatogram), ovvero il cromatogramma della corrente ionica totale, che rappresenta l'intensità totale degli ioni prodotti in funzione del tempo;
- SINGLE ION MONITORING (SIM): in questo modo si va a quantificare una specifica molecola presente all'interno della miscela, poiché l'analizzatore acquisisce solo le masse ioniche di interesse. Ha sensibilità e selettività maggiori rispetto al metodo precedente, in quanto il tempo di scansione non viene sprecato per molecole non rilevanti.
- MULTIPLE REACTION MONITORING (MRM): questa modalità serve per valutare due o più frammenti di ioni della sostanza cercata in un singolo ciclo.

SCOPO DELLO STUDIO

Questo studio si prefigge di mettere a punto un metodo per determinare la presenza di α - e β -amanitina nel plasma e nelle urine dei casi di intossicazione da Funghi che afferiscono al DEA (Dipartimento di Emergenza Urgenza e Accettazione) dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Queste due matrici permettono di valutare l'esposizione recente alle tossine, e attraverso quest'analisi si può avere la diagnosi certa di avvelenamento, procedendo con una terapia il più mirata possibile ed escludendo i soggetti negativi. Per le amanitine, peptidi polari e idrosolubili è stato utilizzato un sistema di analisi UPLC-MS/MS, sensibile e specifico.

MATERIALI E METODI

Preparazione dei campioni

Reagenti

- Acido formico (HCOOH) 99% purezza, per analisi, Carlo Erba, Milano, Italia;
- Acido acetico glaciale (CH₃COOH), Carlo Erba, Milano, Italia;
- Metanolo (CH₃OH) per HPLC ultrapuro, Carlo Erba, Milano, Italia;
- Acqua MilliQ, 18mΩ, Millipore, Burlington, MA, USA;
- Idrossido d'ammonio (NH₄OH) 30%, Carlo Erba, Milano, Italia.
- Acetonitrile (CH₃CN) per HPLC ultrapuro, Carlo Erba, Milano, Italia;
- Diclorometano (CH₂Cl₂) 99.9% purezza, Carlo Erba, Milano, Italia;
- Cloroformio (CHCl₃) 99% purezza, Carlo Erba, Milano, Italia;
- Soluzioni di α- e β-amanitina 1 mg/ml in metanolo, estratte da *A. phalloides* al 90%.

Strumentazione

- Cappa biologica a flusso laminare;
- Miscelatore a vortice Velp Scientifica: vortex per la miscelazione di sostanze in provetta attraverso un movimento circolare e oscillante;
- Bagno a ultrasuoni Branson 3510, Branson;
- Centrifuga Allegra™ 6KR, Beckman Coulter: sfrutta la forza centrifuga per separare le componenti di un campione in base alla loro densità;
- Agitatore rotante per provette per miscelazione con moto "a capovolgimento";
- Vac Elut SPS 24, Agilent (Santa Clara, CA, USA): attraverso un sistema di vuoto (vacuum) favorisce lo svuotamento delle colonnine durante la SPE;
- Reacti-Therm III #TS-18823, Thermo Scientific (Waltham, MA, USA): evaporatore in flusso di azoto con base termostata;
- Pipette automatiche a volume variabile, Eppendorf;
- Puntali per pipette automatiche;
- Provette in vetro sodo-calcico con bordo diritto 12 x 75 mm;
- Provette in vetro sodo-calcico con bordo diritto 16 x 100 mm;
- Provette in vetro filettate;
- Cartucce (colonnine) Bond Elut C18, 3 ml, Agilent;

- Cartucce (colonnine) Oasis® MCX, 3 ml, Waters Corporation (Milford, MA, USA);
- Vials coniche con insert in polipropilene e tappo a scatto, Agilent;
- Cromatografo liquido Acquity UPLC accoppiato a spettrometro di massa a triplo quadrupolo Xevo TQ-S micro, Waters, con sistema di refrigerazione per i campioni e compartimento termostato per le colonne; l'acquisizione dei dati è stata controllata con il software MassLynx®, Waters.

Preparazione della curva di calibrazione – metodo 1

Il controllo negativo, o *blank*, consente di ottenere informazioni sull'eventuale presenza di interferenti, dovute a fonti esterne o interne al laboratorio (contaminazioni). Per questo progetto è stato utilizzato plasma da donatori, risultati negativi agli esami sierologici e molecolari; in questi soggetti la concentrazione di α - e β -amanitina era nulla.

Come si può vedere dalla Tabella 1, ad ogni provetta sono stati aggiunti 50 μ l di IS MIX a 1 μ g/ml, mentre dal punto 2 al punto 6 è stata aggiunta anche una determinata quantità di MIX AMANITINE. Per i punti bassi della curva, gli spikes 5 e 10, è stata utilizzata una diluizione 1:4 della soluzione madre (2 μ g/ml in metanolo), impiegata per i tre punti più alti (spikes 25, 50 e 125). Inoltre, per ogni punto della curva a partire dal controllo negativo, in ogni provetta sono stati pipettati 1.2 ml di plasma blank.

N°	CONCENTRAZIONE DELLO SPIKE	Q.TÀ MATRICE	INDICAZIONI
1	BLANK	1.2 ml	+ 50 μ l IS MIX (1 μ g/ml)
2	SPIKE 5 ng/ml	1.2 ml	+ 50 μ l IS MIX (1 μ g/ml) + 12 μ l MIX AMANITINE (0.5 μ g/ml)
3	SPIKE 10 ng/ml	1.2 ml	+ 50 μ l IS MIX (1 μ g/ml) + 24 μ l MIX AMANITINE (0.5 μ g/ml)
4	SPIKE 25 ng/ml	1.2 ml	+ 50 μ l IS MIX (1 μ g/ml) + 15 μ l MIX AMANITINE (2 μ g/ml)
5	SPIKE 50 ng/ml	1.2 ml	+ 50 μ l IS MIX (1 μ g/ml) + 30 μ l MIX AMANITINE (2 μ g/ml)
6	SPIKE 125 ng/ml	1.2 ml	+ 50 μ l IS MIX (1 μ g/ml) + 75 μ l MIX AMANITINE (2 μ g/ml)

Tabella 1: Punti di calibrazione per il metodo 1.

L'IS MIX contiene Cocaina-D3, Benzoilecgonina-D3, Codeina-D3, Morfina-D3, 6-MAM-D3, Amfetamina-D5, Metamfetamina-D5, MDMA-D5, MDA-D5, MDEA-D5, Ketamina-D4, Buprenorfina-D4, Metadone-D3, Nalorfina e MDPA.

Il MIX AMANITINE (2 µg/ml) è stato preparato a partire da due soluzioni: una di α- e una di β-amanitina, entrambe a 100 µg/ml; queste sono state a loro volta ottenute diluendo 1:10 le soluzioni standard.

Preparazione dei campioni – metodo 1

Prima di procedere, i campioni di sangue intero sono stati centrifugati a 3500 giri/minuto (rpm) per 15 minuti, al fine di ottenere il plasma.

In provette di vetro 16 x 100 mm sono stati posti 1.2 ml di campione, plasma o urina, e 50 µl di IS MIX com'è stato fatto in precedenza per il controllo negativo e la curva di calibrazione.

Da questo momento il blank, gli spikes e i campioni seguono la medesima procedura.

A tutte le provette vengono aggiunti 2.4 ml di una soluzione acquosa 1% di acido formico (pH 2) e si procede all'agitazione con vortex per 30 secondi sotto cappa al fine di far precipitare le molecole proteiche, che potrebbero intasare i pori della cartuccia.



Figura 8: Vortex.

Si prosegue con la sonicazione: gli ultrasuoni, trasmessi in una vasca contenente acqua – che può essere termostata – consentono una rapida dissoluzione dei soluti all'interno dei solventi; per questo le provette vengono sottoposte a questo trattamento per 10 minuti, ognuna chiusa da un foglietto di alluminio.



Figura 9: Bagnetto a ultrasuoni.

Lo step successivo prevede la centrifugazione delle provette a 3000 rpm per 5-10 minuti. Nel frattempo si può procedere con la prima fase della SPE, il condizionamento delle colonnine, che in questo metodo prevede quattro steps:

- Aggiungere 3 ml di 1% acido acetico in acqua;
- Aggiungere 5 ml di acqua MilliQ;
- Aggiungere 5 ml di 1% acido formico in acqua;
- Lasciar sgocciolare le colonnine, precedentemente numerate, senza “tirare a secco”.



Figura 10: Vac Elut SPS 24 (di fronte).



Figura 11: Vac Elut SPS 24 (dall'alto).

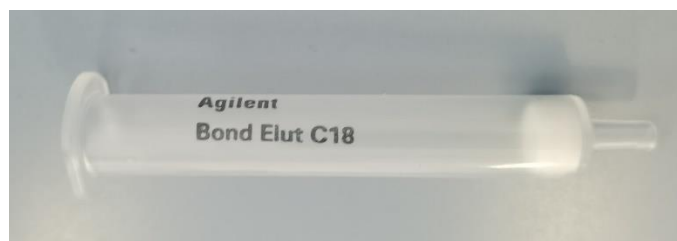


Figura 12: Cartuccia per SPE.

Seguono l'applicazione dei campioni nelle colonnine e la fase del lavaggio; quest'ultimo si effettua aggiungendo alle colonnine 10 ml di soluzione 1% acido acetico in acqua e poi tirando a secco.

A questo punto si inseriscono, all'interno del collettore, delle provette 12 x 75 mm numerate, che saranno necessarie per raccogliere l'eluato – ovvero il prodotto dell'ultimo passaggio della SPE: l'eluizione, appunto; per questo step è necessario aggiungere nelle colonnine 10 ml di 2% NH_4OH in metanolo.

Successivamente si deve “portare a secco” l'eluato attraverso un flusso d'azoto, proveniente dall'evaporatore e direzionato attraverso degli aghi verso le provette: queste sono poste negli appositi spazi in un blocchetto di metallo termostato.



Figura 13: Evaporatore in flusso d'azoto.

Infine i campioni vengono ricostituiti con 100 μl di soluzione apposita, composta da 0.1% acido formico in acqua MilliQ, e metanolo (9:1), vortexati e trasferiti nelle vials con insert chiuse con tappo a scatto per l'analisi con UPLC-MS/MS.

Preparazione della curva di calibrazione – metodo 2

Anche per questo metodo ad ogni provetta, contenente 1.2 ml di plasma, sono stati aggiunti 50 µl di IS MIX a 1 µg/ml, mentre dal punto 2 è stata aggiunta anche una determinata quantità di MIX AMANITINE a 2 µg/ml.

N°	CONCENTRAZIONE DELLO SPIKE	Q.TÀ MATRICE	INDICAZIONI
1	BLANK	1.2 ml	+ 50 µl IS MIX (1 µg/ml)
2	SPIKE 25 ng/ml	1.2 ml	+ 50 µl IS MIX (1 µg/ml) + 15 µl MIX AMANITINE (2 µg/ml)
3	SPIKE 50 ng/ml	1.2 ml	+ 50 µl IS MIX (1 µg/ml) + 30 µl MIX AMANITINE (2 µg/ml)
4	SPIKE 125 ng/ml	1.2 ml	+ 50 µl IS MIX (1 µg/ml) + 75 µl MIX AMANITINE (2 µg/ml)
5	SPIKE 150 ng/ml	1.2 ml	+ 50 µl IS MIX (1 µg/ml) + 90 µl MIX AMANITINE (2 µg/ml)

Tabella 2: Punti di calibrazione per il metodo 2.

Preparazione dei campioni – metodo 2

I campioni di sangue intero sono centrifugati per ottenere il plasma.

In provette di vetro 16 x 100 mm sono stati posti 1.2 ml di campione, plasma o urina, e 50 µl di IS MIX; sono stati aggiunti anche al blank e agli spikes, come per il metodo sopracitato.

Da questo momento il blank, gli spikes e i campioni seguono la medesima procedura.

A tutte le provette vengono aggiunti 2 ml di acetonitrile e si procede all'agitazione con vortex per 30 secondi sotto cappa, anche in questo caso perché le proteine precipitano; si procede alla centrifugazione delle provette, a 3000 rpm per 10-15 minuti, chiuse con un quadratino di foglio di alluminio.

A questo punto viene prelevato il surnatante e posto in provette filettate da 15 ml, precedentemente lavate ed asciugate, e si esegue l'estrazione liquido-liquido, per cui bisogna:

- Aggiungere 5 ml di diclorometano;
- Agitare manualmente dopo aver tappato le provette con tappo a vite, ponendo un quadratino di foglio di alluminio per una chiusura più ermetica;

- Estrarre per inversione per 15 minuti con l'agitatore rotante;
- Centrifugare a 3000 rpm per 10 minuti.

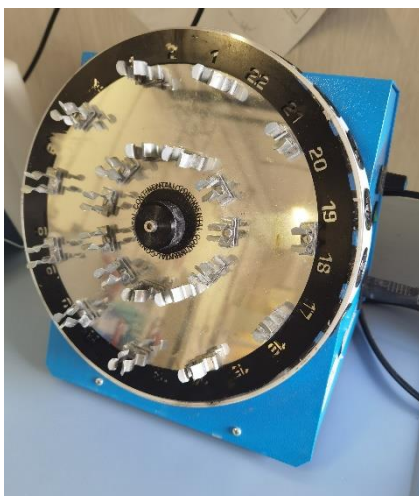


Figura 14: Agitatore rotante.

Lo step successivo prevede che si prelevi nuovamente il sopranatante, che corrisponde alla fase acquosa, e che si trasferisca nelle cartucce per la SPE, precedentemente condizionate con 2 ml di metanolo seguiti da 2 ml di acqua MilliQ; l'estratto acquoso poi va tirato a secco. Per la SPE con questo metodo sono state utilizzate colonnine differenti, ossia le Oasis® MCX di Waters.



Figura 15: Cartuccia per SPE.

Si procede con il lavaggio, 1 ml di 5% metanolo in cloroformio, e si eluisce con 6 ml di metanolo. Anche con questo metodo l'eluato va fatto evaporare con flusso di azoto e ricostituito, ma con 150 µl di soluzione – 0.1% acido formico in acqua MilliQ, e metanolo (9:1). Come nel metodo precedente, segue agitazione con vortex e trasferimento nelle vials con insert chiuse con tappo a scatto per l'analisi con UPLC-MS/MS.

Per questo metodo, inoltre, si è deciso di raccogliere sia il diclorometano utilizzato nella LLE sia la soluzione per il lavaggio della SPE; entrambi sono stati fatti evaporare come l'eluato e ricostituiti allo stesso modo, vortexati e trasferiti nelle vials.

Analisi dei campioni – UPLC-MS/MS

Lo strumento utilizzato per determinare, identificare e quantificare le amatossine è Xevo TQ-S micro di Waters, con metodo di ionizzazione positiva (ESI+).

La separazione cromatografica dei campioni avviene su una colonna Acquity UPLC® BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm) ad una temperatura di 60 °C, con il gradiente di eluizione mostrato in Tabella 2, e che utilizza come solventi una fase A corrispondente ad acqua 0.1% acido formico e una fase B di metanolo. I parametri di UPLC impostati sono: flusso di 0.4 µl/min, volume di iniezione di 5 µl, durata della singola analisi di 14 minuti.

Tempo (min)	Flusso (ml/min)	%A	%B
Iniziale	0.400	95.0	5.0
4.00	0.400	95.0	5.0
6.50	0.400	35.0	65.0
10.00	0.400	35.0	65.0
10.50	0.400	10.0	90.0
12.00	0.400	10.0	90.0
12.50	0.400	95.0	5.0
14.00	0.400	95.0	5.0

Tabella 3: Gradiente del solvente di eluizione.

RISULTATI

È stato sviluppato un Tune File, che ha permesso allo strumento di lavorare con parametri ottimizzati per l'analisi delle due amatossine in esame:

- Temperatura della sorgente: 148 °C;
- Temperatura di vaporizzazione: 350 °C;
- Voltaggio dello spray a livello del capillare: 3.05 kV;
- Flusso del gas attraverso il cono: 20 l/ora.

I parametri utilizzati per l'analisi in MRM sono riassunti in Tabella 4.

MOLECOLA	PARENT (m/z)	DAUGHTERS (m/z)	CONO (V)	COLLISIONE (V)
α-amanitina	919.33	901.53	44	28
		259.13	44	44
β-amanitina	920.48	902.44	42	26
		259.13	42	42

Tabella 4: Parametri per l'analisi in MRM su Xevo TQ-S micro (Waters).

Le transizioni ioniche corrispondenti alla frammentazione degli ioni che sono state utilizzate sono 919.33 > 901.53 > 259.13 per l'α-amanitina e 920.48 > 902.44 > 259.13 per la β-amanitina, poiché entrambe le molecole hanno prodotto un addotto con lo ione idrogeno e sono andati incontro a disidratazione $[M+H - H_2O]^+$.

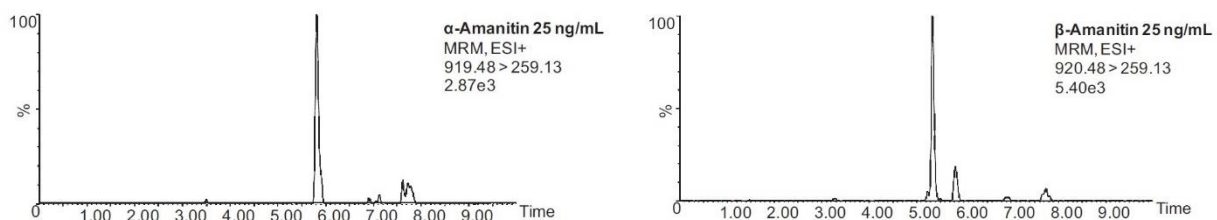


Figura 16: Cromatogrammi MS/MS dei due analiti in esame.

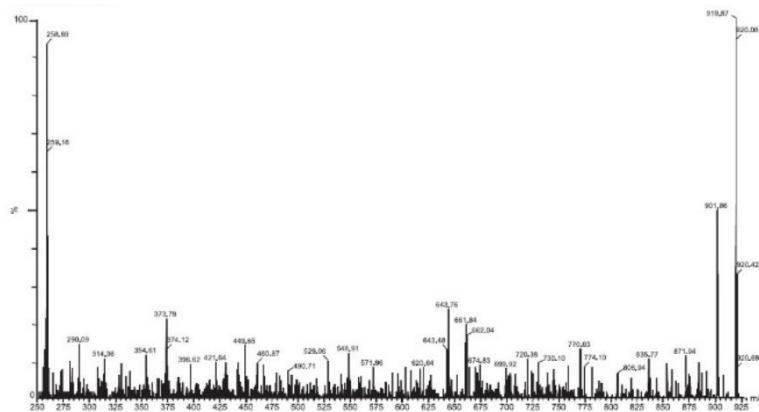


Figura 17: Spettro di massa e pattern di frammentazione dell' α -amanitina.

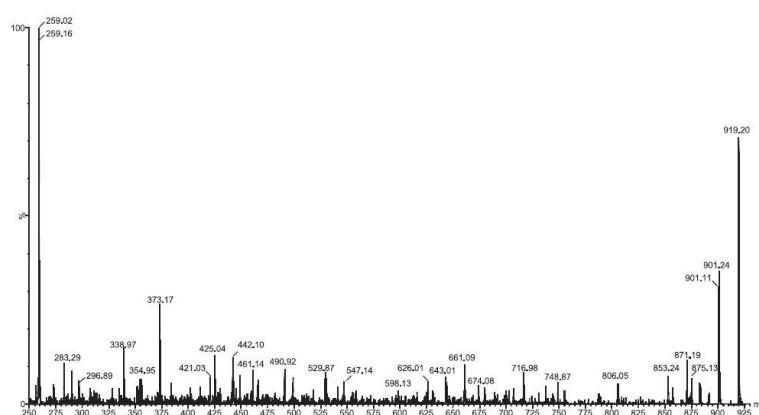


Figura 18: Spettro di massa e pattern di frammentazione della β -amanitina.

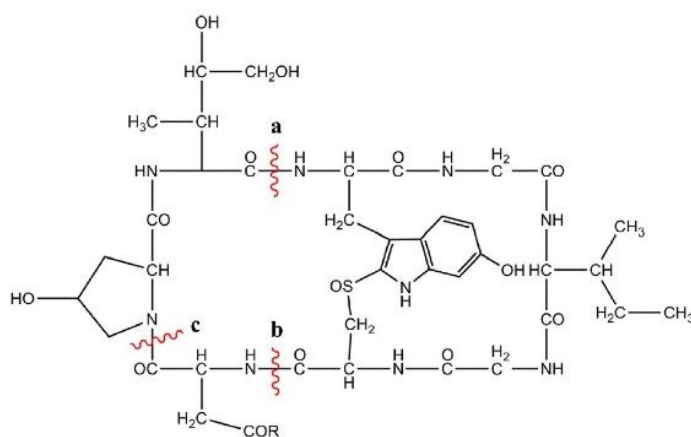


Figura 19: Frammentazione degli ioni (m/z 259).

Il tempo di ritenzione è risultato essere 5.28 minuti per entrambe le molecole, è quindi necessario controllare le transizioni del singolo analita per discriminarle.

Con il primo metodo si è cercato di includere concentrazioni molto basse degli analiti – 5 e 10 ng/ml – dal momento che rispecchiano abbastanza bene le concentrazioni nelle matrici biologiche; i segnali ottenuti, tuttavia, non sono risultati soddisfacenti. Il primo punto della curva da considerare sarebbe 25 ng/ml, ma non si è riscontrata una linearità di segnale con i punti successivi.

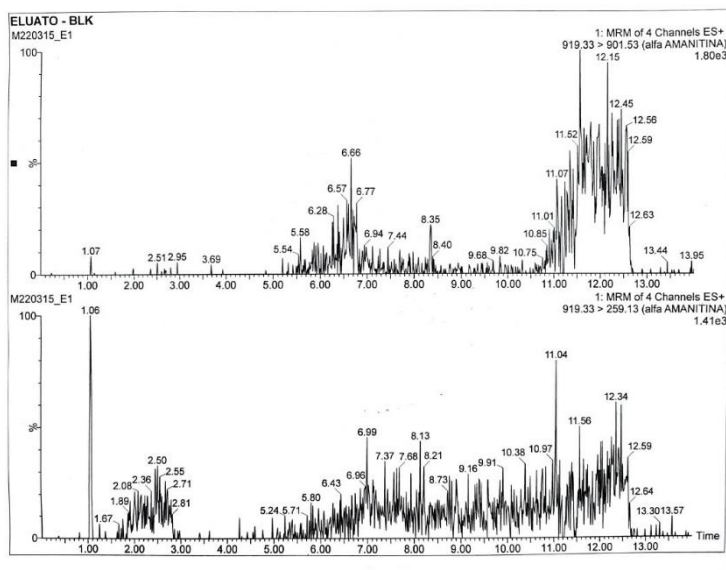


Figura 20: Cromatogramma del blank (α -amanitina).

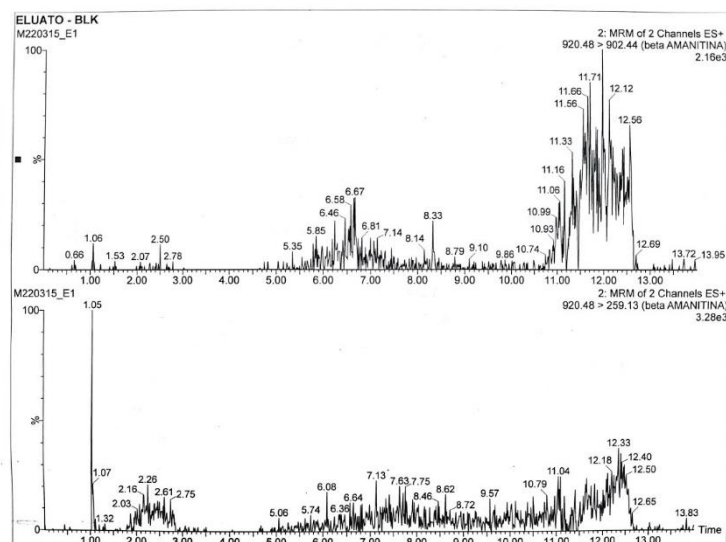


Figura 21: Cromatogramma del blank (β -amanitina).

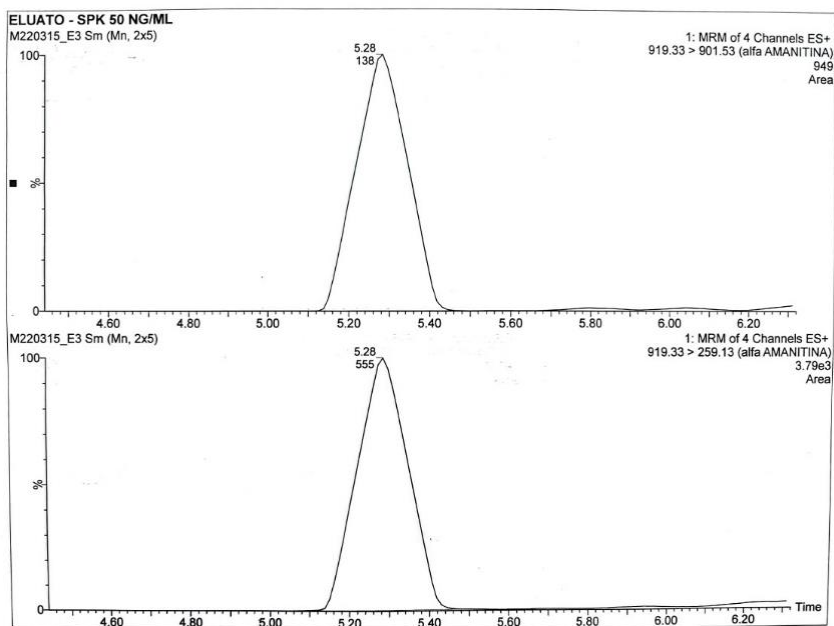


Figura 22: Cromatogramma dello spike 50 (α -amanitina).

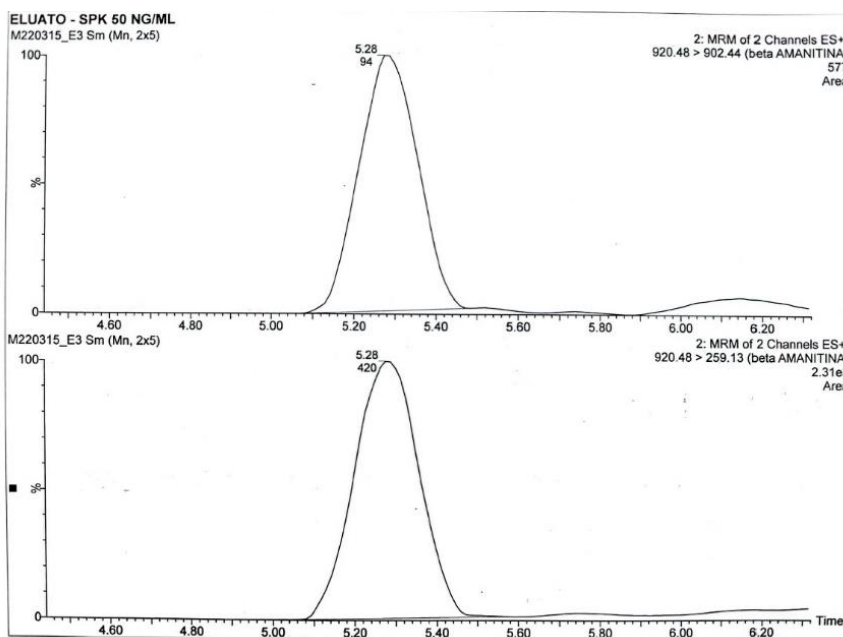


Figura 23: Cromatogramma dello spike 50 (β -amanitina).

In Figura 24 è mostrato il tracciato dello spike 125 ng/ml estratto col primo metodo; si può vedere come l'unico picco sia in corrispondenza dei 6 minuti. Questo segnale quindi proviene da un'interferenza, non dagli analiti.

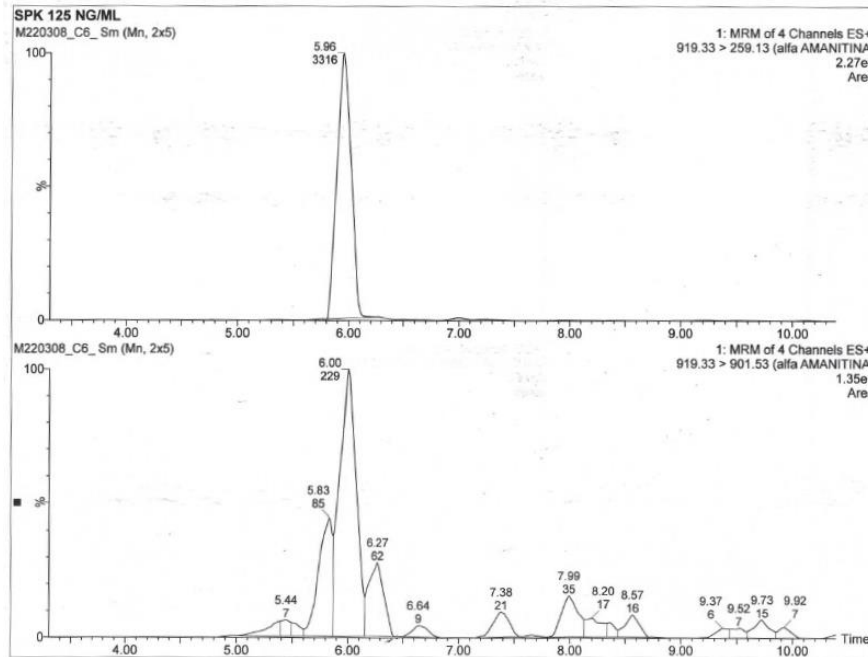


Figura 24: Spike 125 ng/ml col metodo 1.

Nel secondo metodo l'attenzione si è spostata su punti più alti e l'analisi dell'eluato ha dimostrato una buona correlazione tra le concentrazioni e le aree dei picchi; in particolare per i punti 50, 125 e 150 ng/ml. Si è visto inoltre come una parte delle amatoossine ricercate sia rimasta nel diclorometano e una nel lavaggio: i cromatogrammi, infatti, mostrano un picco anche a 5.27 minuti – corrispondente al tempo di ritenzione degli analiti ricercati. In Tabella 5 vengono riportate le aree dei picchi dopo l'analisi sull'eluato, sul diclorometano e sul lavaggio alla concentrazione 125 ng/ml.

	α -amanitina (919.33 > 259.13)	β -amanitina (920.48 > 259.13)
Area eluato	3245	2182
Area diclorometano	2908	2629
Area lavaggio	2067	2488

Tabella 5: Aree dei picchi.

Il coefficiente di determinazione R^2 misura il legame tra la variabilità dei dati e la correttezza del modello statistico utilizzato; ha un valore compreso tra 0 ed 1, che si osserva quando si ha una perfetta linearità. Si può vedere, confrontando la Figura 25 con la Figura

26 per quanto riguarda la α -amanitina, che questo valore passa da 0.9445 a 0.9816 se si esclude il primo spike – ossia il punto a 25 ng/ml.

Allo stesso modo, paragonando la Figura 27 con la Figura 28 per quanto concerne la β -amanitina, che il valore di R^2 aumenta da 0.8839 a 0.9219 se si esclude lo spike 25.

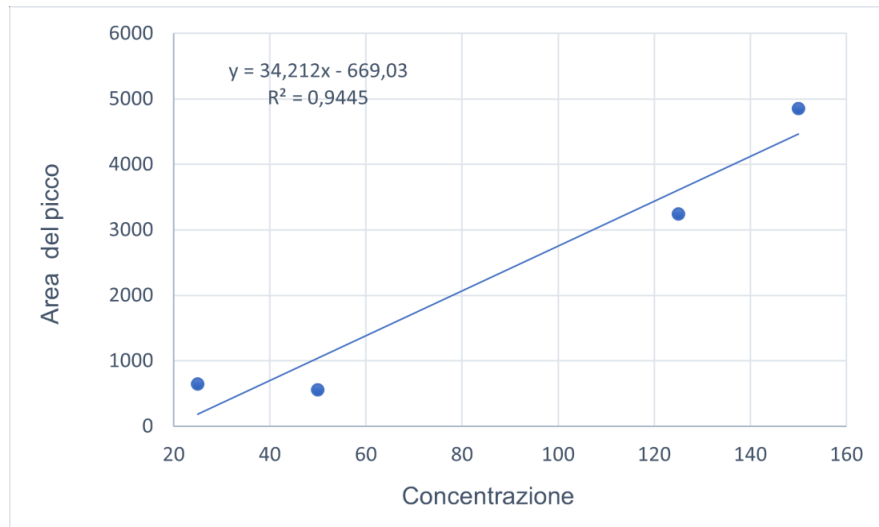


Figura 25: Curva di calibrazione dell' α -amanitina (25, 50, 125, 150 ng/ml).

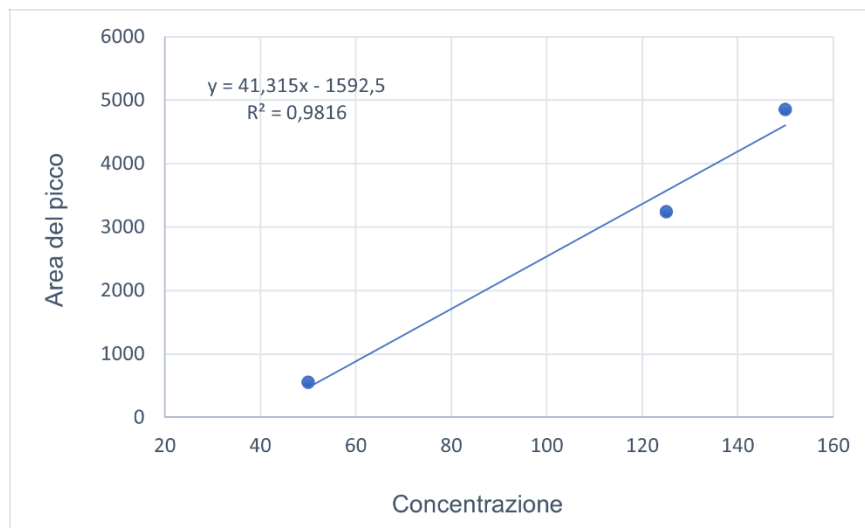


Figura 26: Curva di calibrazione dell' α -amanitina (50, 125, 150 ng/ml).

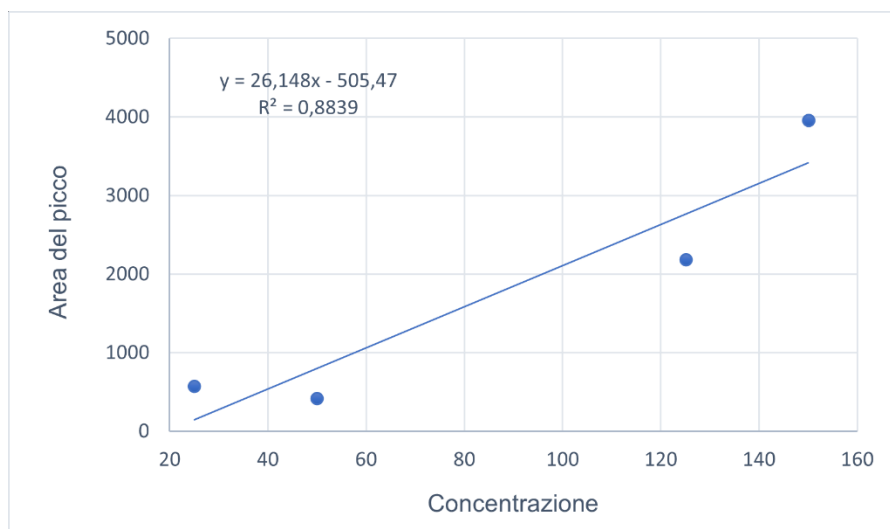


Figura 26: Curva di calibrazione della β -amanitina (25, 50, 125 e 150 ng/ml).

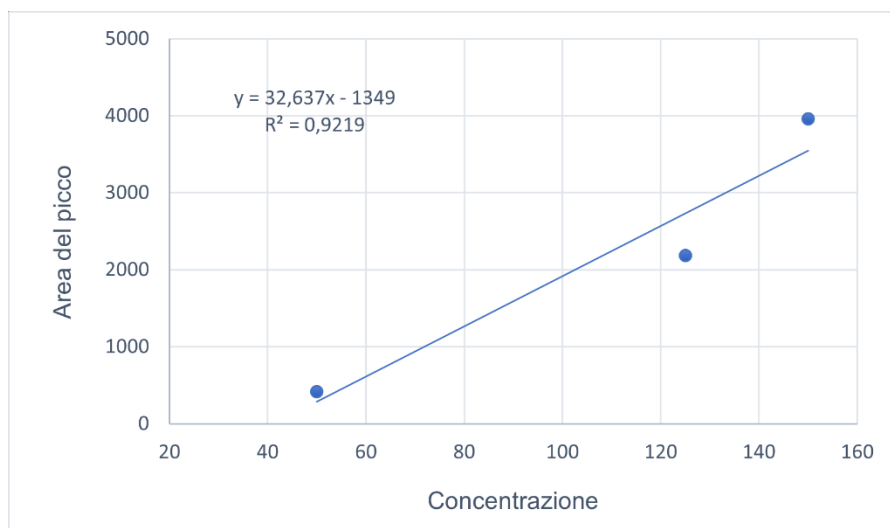


Figura 27: Curva di calibrazione della β -amanitina (50, 125 e 150 ng/ml).

Applicazione a casi reali

In seguito ad ottimizzazione il metodo è stato applicato a casi reali: sono stati rianalizzati campioni di plasma e urina pervenuti in laboratorio nel periodo novembre 2020 - ottobre 2021, accompagnati da richiesta di ricerca mirata per amanitine e conservati a -20 °C. Tre erano risultati positivi, tre negativi; i risultati ottenuti corrispondono a quelli attesi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Come si è visto l'elevata letalità delle amanitine, dovuta sia alle caratteristiche di queste molecole sia alla larga diffusione della specie fungina responsabile, rende necessaria una diagnosi di intossicazione in tempi ristretti per migliorare la prognosi del paziente. Il metodo di estrazione ed analisi presentato in questo lavoro, tuttavia, risulta lungo ed indaginoso, soprattutto per quanto riguarda la prima parte; per questo nei primi stadi dell'avvelenamento si richiedono altri test diagnostici, in particolare di tipo biochimico, per indirizzare la diagnosi.

Un altro limite di questa procedura è rappresentato dal quantitativo cospicuo sia di campione richiesto sia di reagenti utilizzati durante la SPE del metodo 1, soprattutto in un'era diagnostica che tende alla minimizzazione dei volumi necessari all'analisi. In questo caso come matrici vengono utilizzati l'urina o il plasma. Di quest'ultimo in particolare non è sempre possibile ottenere più di 1 ml; necessitando di centrifugazione, infatti, il prelievo dovrebbe essere di almeno un quantitativo triplo. Questo problema si evidenzia maggiormente nei casi pediatrici, dove il quantitativo ematico risulta minimo.

Studi futuri potrebbero essere proiettati verso l'utilizzo di solventi diversi durante la preparazione dei campioni, in modo tale da riuscire a raccogliere solo nell'eluato le molecole d'interesse.

BIBLIOGRAFIA

1. Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon* 1998;36(1):13-24.
2. Karlson-Stiber C, Persson H. Cytotoxic fungi--an overview. *Toxicon*. 2003;42(4):339-49.
3. Floersheim GL. Influence of ethanol on toxicity of paraquat and *Amanita phalloides*. *Lancet*. 1992;339(8790):437.
4. Klan J, Zima T, Baudisova D. Potentiated effect of ethanol on *Amanita phalloides* poisoning. *Czech Mycology*. 1994;47(2):145-150.
5. Belliardo F, Massano G, Accomo S. Amatoxins do not cross the placental barrier. *Lancet* 1983;1(8338):1381.
6. Dolfi F, Gonnella R. Acute *amanita phalloides* poisoning in the second pregnancy trimester. *Minerva Anesthesiol*. 1994;60(3):153-4.
7. Kaufmann M, Müller A, Paweletz N, Haller U, Kubli F. Fetal damage due to mushroom poisoning with *amanita phalloides* during the first trimester of pregnancy. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 1978;38(2):122-4.
8. Beer JH. The wrong mushroom. Diagnosis and therapy of mushroom poisoning, especially of *Amanita phalloides* poisoning. *Schweiz Med Wochenschr*. 1993;123(17):892-905.
9. Faulstich H, Talas A, Wellhöner HH. Toxicokinetics of labeled amatoxins in the dog. *Arch Toxicol*. 1985;56(3):190-4.
10. Piqueras J. Hepatotoxic mushroom poisoning: diagnosis and management. *Mycopathologia*. 1989;105(2):99-110.
11. Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, Monteil H. Toxin content, phallotoxin and amatoxin composition of *Amanita phalloides* tissues. *Toxicon*. 1993;31(6):803-7.
12. Garcia J, Costa VM, Carvalho A, Baptista P, de Pinho PG, de Lourdes Bastos M, Carvalho F. *Amanita phalloides* poisoning: Mechanisms of toxicity and treatment. *Food Chem Toxicol*. 2015;86:41-55.
13. Douglas A. Skoog, James F. Holler, Stanley R. Crouch, *Chimica analitica strumentale*, 2009, EDISES 2.
14. Jurgen H.Gross, *Spettrometria di massa*, 2016, EdISES.

RINGRAZIAMENTI

Inizialmente ero scettica all'inserimento di questa sezione, ma arrivata a questo punto mi sembra doveroso.

Ringrazio la professoressa Favretto per avermi dato la possibilità di frequentare il laboratorio di Medicina Legale e Tossicologia e per avermi seguita nella realizzazione di questo elaborato.

Ringrazio tutti i tecnici del laboratorio per avermi accolta e fatta sentire parte del gruppo, in particolare Anna; ti sarò sempre grata per i consigli e la disponibilità che hai mostrato nei miei confronti.

Ringrazio i miei genitori e la mia famiglia per avermi sempre supportata, nonostante i numerosi intoppi che questo percorso ha subito.

Ringrazio Chiara, per questi (quasi) vent'anni di amicizia, esperienze, ricordi e risate. Se sono la persona che sono oggi, è anche grazie a te.

Ringrazio le persone che ho avuto il piacere di incontrare e conoscere all'università, soprattutto Giulia, Elena, Anna, Alessia e Adele. Grazie per le risate e per il tempo trascorso con la sottoscritta e le sue stranezze.

Ringrazio le mie coinquiline, Aurora, Chiara e Tiziana, per il tempo passato insieme e per aver imparato a giocare a Mario Kart – mi state dando una certa soddisfazione, nonostante non vi piaccia usare la derapata manuale. Ammettete che la disdegnate solo perché non la sapete usare.

Martina