

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO HPLC-FLD PER LA DETERMINAZIONE DI 4'-O-METILPIRIDOSSINA NEI SEMI DI GINKGO BILOBA L.

Orgiu F.¹, Colombo F.,¹ Di Lorenzo C.¹, Frigerio G.¹, Valoti E.², Restani¹

¹ Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Italia

² Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Milano, Italia

I semi di *Ginkgo biloba* sono ampiamente utilizzati nella cucina tradizionale cinese sia per il loro valore nutrizionale sia per le caratteristiche organolettiche. È però noto che i semi di questa pianta possono essere responsabili di eventi avversi a causa della possibile presenza della 4'-O-metilpiridossina, conosciuta anche come ginkgotossina. Questa molecola ad azione neurotossica è strutturalmente simile alla vitamina B6, di cui altera, a elevate concentrazioni, il metabolismo e le funzioni fisiologiche (1). I soggetti maggiormente sensibili agli eventi avversi sono i bambini, a causa del ridotto peso corporeo e della loro limitata capacità metabolica.

Il presente lavoro ha origine da un caso di avvelenamento occorso in un bambino di 23 mesi che, in seguito a ingestione di un numero elevato ma imprecisato di semi di *Ginkgo biloba*, ha manifestato crisi convulsive tonico-cloniche in assenza di febbre (2).

Al fine di garantire la sicurezza d'uso nel consumo dei semi e, considerando come la cucina asiatica si stia rapidamente diffondendo nei Paesi occidentali, è evidente la necessità di condurre approfonditi studi per la caratterizzazione e la quantificazione dell'MPN.

A tale scopo, una nuova metodica cromatografica HPLC (accoppiata a fluorimetro) è stata messa a punto e convalidata seguendo le linee guida del protocollo FDA relativo ai metodi bioanalitici (2013).

I parametri tecnici di validazione valutati sono: 1) idoneità del sistema, 2) precisione, 3) linearità, 4) recupero. Tali parametri soddisfano i criteri di accettabilità imposti dalle linee guida: il coefficiente di correlazione $R^2 > 0.98$ indica una soddisfacente linearità del metodo e la metodica messa a punto risulta sufficientemente sensibile, come dimostrato dai valori di LOD e LOQ pari a 0.14 ng/mL e 0.47 ng/mL, rispettivamente. Tali valori corrispondono a un quantitativo di MPN nel campione pari a 2.8 ng/g e 9.4 ng/g, rispettivamente.

La metodica messa a punto è stata infine applicata ad alcuni campioni di origine giapponese. Il contenuto di ginkgo tossina rilevato nei campioni è di 325.53 ± 114.12 µg/g. Pur evidenziando una notevole variabilità nel contenuto di ginkgotossina, essa è risultata in accordo con i valori presenti in letteratura (compresi tra 170 e 400 µg/g).

La metodica cromatografica è risultata quindi idonea, efficace, riproducibile e adatta all'analisi dei semi di ginkgo per la conferma della presenza e quantificazione della 4'-O-metilpiridossina.

Il metodo verrà applicato a un numero più elevato di campioni allo scopo di confermare i dati ottenuti e per valutare, in parallelo, l'eventuale influenza dell'origine geografica sul contenuto di MPN.

Riferimenti bibliografici

1. Arenz, A., Klein, M., Fiehe, K., Groß, J., Drewke, C., Hemscheidt, T, Leistner, E. 1996. Occurrence of neurotoxic 4'-methylpyridoxine in *Ginkgo biloba* leaves, ginkgo medications and Japanese ginkgo food. *Planta Med* 62, 548-551.

2. Di Lorenzo, C., Ceschi, A., Colombo, F., Frigerio, G., Bianchetti, M.G., Lude, S., Von Dechend, M., Valoti, E., Restani, P., 2015. Identification and quantification of biomarkers to confirm the poisoning by *Ginkgo biloba* seeds in a 2-years-old boy; *Toxicol. Res.*, 4, 922-930.