



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

**DOTTORATO DI RICERCA IN AMBIENTE,
PREVENZIONE E MEDICINA PUBBLICA (XXII ciclo)
Coordinatore Prof. Claudio Buccelli**

INDIRIZZO SCIENZE BIOLOGICHE FORENSI

**DETERMINAZIONE DI SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICI
BIOLOGICHE**

Tesi di Dottorato

Tutor

Ch.mo Prof. Antonio Acampora

Dottoranda

Pascale Basilicata

Anno 2008-2009

INDICE

	pag.
1 INTRODUZIONE	1
1.1 Sostanze stupefacenti	1
1.1.1. Definizione di sostanza stupefacente	2
1.1.2. Amfetamine	3
1.1.3. Cocaina	6
1.1.4. Cannabinoidi	8
1.1.5. Oppiacei	10
1.2. Legislazione in ambito Nazionale	13
1.2.1. Classificazione sostanze stupefacenti	13
1.2.2. Accertamenti con finalità tossicologico-forensi	14
1.3. Determinazione di sostanze d'abuso in matrici biologiche	17
1.3.1. Urina	17
1.3.2. Sangue	18
1.3.3. Matrice cheratinica	18
1.3.4. Incorporazione delle sostanze d'abuso in matrici cheratiniche	19
1.4. Rivelazione degli analiti	22
1.4.1. Test iniziali (Screening)	22

1.4.2	Analisi di conferma	23
1.4.3	Cut-off analitico	23
1.5	Droghe e lavoro	24
1.5.1	Procedure Operative: accertamenti di primo livello	26
1.6	Catena di Custodia	29
1.7	Tecniche analitiche	29
1.7.1	Parametri di Validazione del Dato Analitico	29
1.7.2	Estrazione in fase solida (SPE)	31
1.7.3	Head Space/Solid Phase Microextraction (SPME)	32
1.7.4	Analisi di screening e analisi di conferma	33
1.7.5	Gas Cromatografia	34
1.7.6	Spettrometria di Massa	36
1.7.7	Modalità di acquisizione Full Scan e SIM	37
1.7.8	Gas Cromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa	38
1.7.9	Principi di derivatizzazione	39
1.7.10	Metodi di quantificazione	40
1.7.11	Standard Interno	40
1.7.12	Curve di calibrazione	41

1.8	Scopo del progetto di tesi	41
2	PARTE SPERIMENTALE	44
2.1	Materiali	44
2.2	Metodi	45
2.2.1	Campionamento	45
	2.2.1.1 Matrice cheratinica	45
	2.2.1.2 Matrice urinaria	46
	2.2.1.3 Procedura di campionamento per gli accertamenti di assenza di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope nei lavoratori	47
2.2.2	Preparazione dei campioni	50
	2.2.2.1 Campioni per le curve di calibrazione	50
	2.2.2.2 Valutazione della stabilità e del recupero d'estrazione in urina	52
2.2.3	Analisi della matrice cheratinica	54
	2.2.3.1 Procedura per l'analisi delle amfetamine	54
	2.2.3.2 Procedura per l'analisi di cocaina e oppiacei	54
	2.2.3.3 Procedura per l'analisi dei cannabinoidi	55
2.2.4	Analisi della matrice urinaria	56
	2.2.4.1 Procedura per le analisi di screening	56
	2.2.4.2 Procedura per l'analisi di conferma delle amfetamine	57

2.2.4.3	Procedura per l'analisi di cocaina e oppiacei	58
2.2.4.4	Procedura per l'analisi di cannabinoidi	59
2.2.5	Condizioni strumentali	60
2.2.5.1	Parametri di acquisizione	61
2.2.6	Campioni reali	62
3	RISULTATI E DISCUSSIONE	64
3.1	Sensibilità e specificità	64
3.2	Rette di calibrazione	71
3.3	Accuratezza e precisione	74
3.4	Recupero	76
3.5	Stabilità	79
3.6	Campioni reali	83
4	CONCLUSIONI	89
5	BIBLIOGRAFIA	91
6	ABBREVIAZIONI	94

INTRODUZIONE

La tossicologia forense è la branca della tossicologia analitica che si occupa del riconoscimento di agenti che possono causare una intossicazione e della loro determinazione quantitativa, in analisi con finalità legale di tipo sia civile che penale, con particolare riguardo per le sostanze stupefacenti.

La tossicologia forense è oggi estesa a tutto il campo delle Leggi che tutelano la salute individuale e collettiva.

Proprio a causa del loro valore legale, i risultati provenienti da una indagine di tossicologia forense devono rispettare determinati requisiti: certezza del dato analitico, in ogni fase lavorativa dal prelievo del campione all'analisi; impiego di una tecnica analitica validata e documentata; specificità dell'analisi; valutazione, interpretazione e spiegazione del risultato analitico.

Campi di applicazione di indagini della tossicologia forense sono: monitoraggio di categorie a rischio, il cui lavoro implica elevata responsabilità nei confronti della collettività, come ad es. piloti o autisti di mezzi pubblici; diagnosi di alcool o tossicodipendenza correlata ad uno status pregresso o attuale al quale ricondurre benefici nel trattamento sanzionatorio o carcerario; azione di prevenzione e accertamenti sanitari in occasione della selezione per la leva e dell'arruolamento dei militari; responsabilità in caso di gravi incidenti stradali; cause civili relative alla custodia dei figli, alle adozioni, alle pratiche di separazione e/o divorzio ed anche interpretazione nei casi di morte da acuta intossicazione dovuta a sostanze stupefacenti.

1.1 Sostanze Stupefacenti

Il termine deriva probabilmente da *droog*, termine con il quale gli olandesi definivano il trasporto di prodotti vegetali essiccati via mare dall'Oriente; in Fitognosia il termine droga definisce l'insieme di elementi cellulari di un vegetale, nei quali, all'interno dei vacuoli, siano presenti sostanze del metabolismo secondario, dotate di effetto sulle funzioni fisiologiche dell'uomo.

L'interesse della tossicologia forense per le droghe nasce dal fatto, quindi, che le sostanze attive sul sistema nervoso centrale dell'uomo hanno potere di influire profondamente non solo sui processi mentali, ma anche su molti aspetti del comportamento individuale, creando, spesso, rischi per la salute individuale e collettiva.

1.1.1 Definizione di sostanza stupefacente

Definire che cosa si intenda per sostanza stupefacente è così problematico che, nella maggior parte dei casi, ci si limita a soffermarsi sulle caratteristiche distintive delle singole sostanze definite come stupefacenti, rimandando la loro individuazione alle tabelle di legge nazionali ed internazionali in cui queste sostanze sono elencate. Tali tabelle sono peraltro sempre aperte al successivo inserimento di nuove sostanze assunte a scopo voluttuario, provenienti sia dalla ricerca farmacologica ufficiale, sia dal mondo tecnologico clandestino.

Questo difficile problema definitorio è stato affrontato nel corso della "Convenzione Internazionale sulla disciplina e controllo delle sostanze psicotrope" tenutasi a Vienna nel 1971, poi ratificata e resa esecutiva in Italia con la legge n. 685 del 22 dicembre 1975.¹ Ne è scaturito che, affinché una sostanza possa essere inserita negli elenchi internazionali degli stupefacenti, occorre che l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) abbia constatato che tale sostanza sia in grado di provocare:

1. a) uno stato di dipendenza e
b) uno stimolo o una depressione del sistema nervoso centrale, che dia luogo ad allucinazioni o a disordini della funzione motrice e della facoltà di giudizio e/o del comportamento e/o della percezione e/o dell'umore; oppure
2. che tale sostanza possa dare luogo a degli abusi ed a difetti nocivi comparabili a quelli di una delle sostanze incluse nelle tabelle I, II, III, IV e
3. che esistano ragioni sufficienti per ritenere che tale sostanza possa dare luogo ad abusi tali da costituire un problema di salute pubblica ed un problema sociale tali da giustificare il fatto che la stessa sostanza venga posta sotto il controllo internazionale".

Uno degli elementi fondamentali di questa definizione è il concetto di dipendenza, la quale si può manifestare in ambito psichico, ma anche in ambito fisico: il quadro di dipendenza assume connotati peculiari a seconda della sostanza protagonista dell'abuso.

L'OMS definisce la dipendenza psichica come "un sentimento di bisogno assoluto e la tendenza psicologica che richiede una somministrazione periodica o continuativa della droga per produrre l'effetto desiderato o per evitare disagio".

La dipendenza fisica, invece, è caratterizzata dal fatto che l'interruzione della periodica assunzione di una sostanza stupefacente, oltre al disagio psicologico, provoca la cosiddetta "crisi di astinenza", cioè una serie di disturbi fisici, clinicamente obiettivabili, dovuti ad un alterato stato fisiologico collegato ad una acquisita esigenza biochimica dell'organismo.

È importante sottolineare che non è corretto definire l'assuntore di sostanze stupefacenti come tossicodipendente, in quanto che la tossicodipendenza si instaura dopo una prolungata e frequente assunzione a scopo voluttuario della sostanza protagonista dell'abuso. Questa frequente e reiterata assunzione può anche indurre tolleranza, che consiste nella necessità di aumentare la dose, o posologia, per ottenere lo stesso effetto conosciuto in precedenza, a causa dell'attivazione delle vie metaboliche.

1.1.2 Amfetamine

Le amfetamine sono sostanze di origine sintetica ad azione stimolante sul S.N.C. che agiscono sulla regolazione del sonno, dell'umore, dell'appetito e appartengono al gruppo delle ammine simpatico-mimetiche.²

L'amfetamina (figura 1) può essere assunta per via intranasale, per via endovenosa o per via orale.

La metamfetamina (figura 1) è assunta per via orale, ma anche fumata utilizzando le pipe e assunta per endovena; la somministrazione per fumo ed endovena provoca una rapida dipendenza psicologica.

Gli analoghi metilendiossi (figura 1) dell'amfetamina includono la 3,4-metilendiossi-amfetamina (MDA), la 3,4-metilendiossi-metilamfetamina (MDMA) e la 3,4-metilendiossi-etilamfetamina (MDEA).³

Attualmente si ritiene che l'attività dell'amfetamina e delle sostanze amfetaminosimili si realizzi attraverso molteplici azioni:

- inibizione delle monoamminossidasi (MAO)
- azione diretta sul rilascio di noradrenalina e dopamina dalle terminazioni nervose
- blocco del reuptake delle catecolamine dal vallo sinaptico
- azione diretta sui recettori adrenergici e dopaminergici

Gli effetti possono essere divisi in:

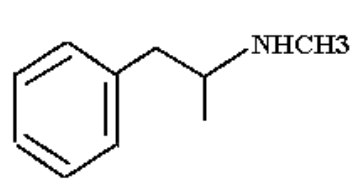
- **Effetti psichici:** aumento delle energie, diminuzione della percezione di fatica, aumento dello stato di vigilanza e dell'autostima, loquacità, irritabilità, agitazione, perdita dell'appetito, manie persecutorie, deliri persecutori. L'uso cronico può determinare un deterioramento mentale.
- **Effetti fisici:** tremori, agitazione motoria, midriasi, insonnia, tachicardia con palpitazioni, ipertensione, iperpiressia.

Nell'uomo l'assorbimento delle amfetamine somministrate per via orale è rapido, il picco plasmatico si raggiunge in circa 2 ore e l'emivita è intorno alle 6-7 ore.

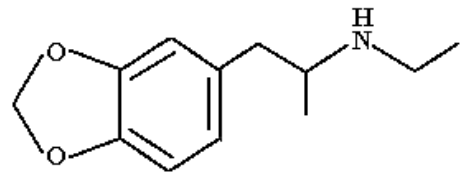
La maggior parte delle amfetamine viene escreta per via renale in forma parzialmente immodificata insieme a metaboliti idrossilati o deaminati.

La più importante via di metabolizzazione è la N-dealchilazione, una reazione ossidativa, catalizzata dal sistema del citocromo P-450, che porta alla formazione di MDA quale principale metabolita dell'MDMA e dell'MDEA.⁴

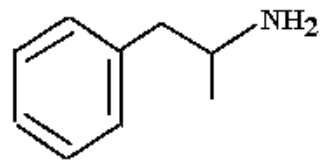
L'escrezione urinaria dipende fortemente dal pH: aumenta nelle urine acide (circa il 70% delle amfetamine vengono escrete nelle prime 24 ore e circa il 90% durante i primi 4 giorni) e diminuisce nelle urine basiche (il 45% nelle prime 24 ore e il 70% entro 5 giorni dall'assunzione).^{3,4}



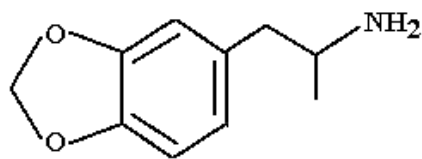
Metamfetamina



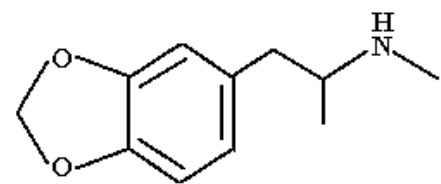
MDEA



Amfetamina



MDA



MDMA

figura 1: Strutture molecolari di metamfetamina, MDEA, amfetamina, MDA, MDMA

1.1.3 Cocaina

La cocaina (figura 2) è una sostanza alcaloide estratta dalle foglie di *Erythroxylon coca*, una pianta originaria delle Ande.

La cocaina può essere assunta in tre modi: può essere fiutata ("sniffata") per via nasale (in forma di sale cloridrato), può essere somministrata endovena o può essere fumata sotto forma di base libera ("*crack*"), che si ottiene per alcalinizzazione del sale ed estrazione con solventi non polari.

La cocaina si lega ai trasportatori della ricaptazione della dopamina nel sistema nervoso centrale, inibendo il reuptake sia della dopamina sia dell'adrenalina. Uno dei sistemi neurali più interessato dall'azione della cocaina trova origine in una regione molto profonda del cervello chiamata "area ventrale del tegmento" (AVT), i cui neuroni si estendono al "Nucleus accumbens", una delle aree chiave del piacere nel cervello.

Gli effetti a breve termine si manifestano con eccitazione, forte stimolazione sessuale, potenziamento delle capacità mentali, diminuzione del senso di fatica, dilatazione delle pupille, vasocostrizione, aumento della temperatura corporea e del ritmo cardiaco, nonché la riduzione della percezione del rischio che può originare comportamenti pericolosi per il consumatore stesso e per la salute di terzi.⁵

La cocaina è assorbita rapidamente da tutti i siti di applicazione comprese le mucose, il tratto gastrointestinale e i polmoni. E' inattivata sia nel plasma sia nel fegato; solo piccole quantità sono escrete immodificate.

Per via orale la cocaina cloridrato è assorbita lentamente e in misura incompleta (circa il 25%), inoltre il farmaco raggiunge l'encefalo molto lentamente, venendo quindi meno la sensazione di "rush" che si ha per altre vie di somministrazione. Inalata sottoforma di polvere, la cocaina cloridrato attraversa scarsamente le mucose; solo il 20-30% del farmaco è assorbito ed i livelli plasmatici raggiungono il massimo entro 30-60 minuti.

Quando la cocaina base libera è vaporizzata e fumata, l'assorbimento è rapido e pressoché completo; gli effetti sono immediati e questi

persistono per 5-10 minuti. Soltanto il 6-32% circa della quantità iniziale raggiunge il plasma, il resto va incontro a pirolisi prima dell'inalazione.

Con l'iniezione endovenosa la cocaina salta tutte queste barriere e il farmaco entra subito in circolo, con un conseguente effetto immediato.

La cocaina ha un'emivita biologica di 30-90 minuti è quasi completamente metabolizzata dalle colinesterasi presenti sia nel plasma che nel fegato.⁵

Il metabolita principale è il composto inattivo benzoilecgonina (BE; figura 2), che può essere ritrovato nell'urina per circa 3 giorni e molto a lungo (15-22 giorni) nei consumatori cronici. Altro metabolita inattivo è l'ecgoninametilestere (EME; figura 2) e solo una piccola quantità di cocaina è metabolizzata ad un intermedio attivo (norcocaina).

La rivelazione di benzoilecgonina nell'urina, comunque costituisce la base per l'accertamento dell'utilizzo di cocaina.

L'uso di cocaina inoltre, associato al consumo di alcool porta alla formazione del cocaetilene (figura 2), un metabolita attivo, che è eliminato più lentamente della cocaina e ciò determina problemi di accumulo ed una maggiore tossicità.^{5,6}

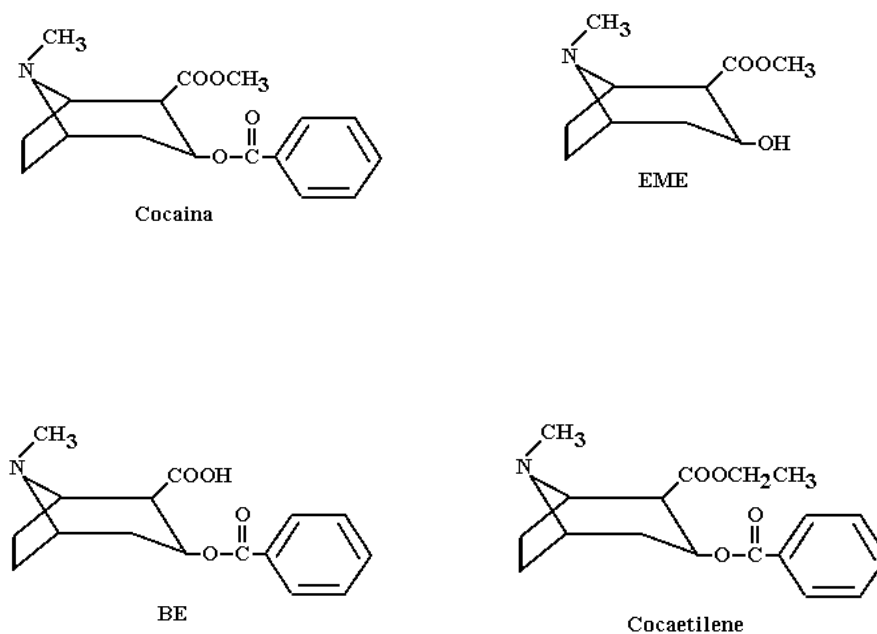


figura 2: Strutture molecolari di cocaina, EME, BE, cocaetilene

1.1.4 Cannabinoidi

Nella cannabis sono stati individuati oltre 60 tipi di cannabinoidi, di cui i più rappresentativi sono: il cannabigerolo (CBG), il cannabicromene (CBC), il cannabidiolo (CBD), il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC), Δ^8 -THC, ed il cannabinolo (CBN).

Il Δ^9 -THC (figura 3) è in larga parte responsabile degli effetti farmacologici e delle proprietà psicoattive della cannabis.²

L'azione dei cannabinoidi è mediata dal legame con specifici recettori (CB) appartenenti al sistema cannabinoergico, sistema legato alla presenza di endocannabinoidi (anandamide, 2-arachidonoilglicerolo, 2-arachidonil-gliceril-etero, virodamina, N-arachidonoildopamina), ai quali è stato attribuito fisiologicamente un ruolo di regolazione inibitoria dell'eccitabilità neuronale.

Il consumo dei cannabinoidi provoca un'alterazione delle funzioni percettive e psicomotorie associati a tachicardia, aumento dell'appetito, broncodilatazione, secchezza delle fauci, riso spontaneo, rossore agli occhi; tali effetti, influenzati dalle condizioni psicologiche di base del consumatore e dalle dosi assunte, possono sfociare in gravi disturbi della sfera comportamentale che comprendono depressione, depersonalizzazione, sintomi schizofrenici.⁷

La via di assunzione privilegiata della *Cannabis* nei paesi occidentali è il "fumo", mentre in alcuni paesi orientali la somministrazione avviene prevalentemente per via orale, sottoforma di decotti o infusi. L'assunzione per *os* comporta una riduzione dell'assorbimento di circa 1/3 a causa della degradazione da parte della flora batterica intestinale; tuttavia i sintomi clinici insorgono più tardi e possono protrarsi per oltre 10 ore.

Dopo 10 minuti dall'assunzione per via inalatoria si raggiunge il picco plasmatico, a cui segue la rapida manifestazione degli effetti.

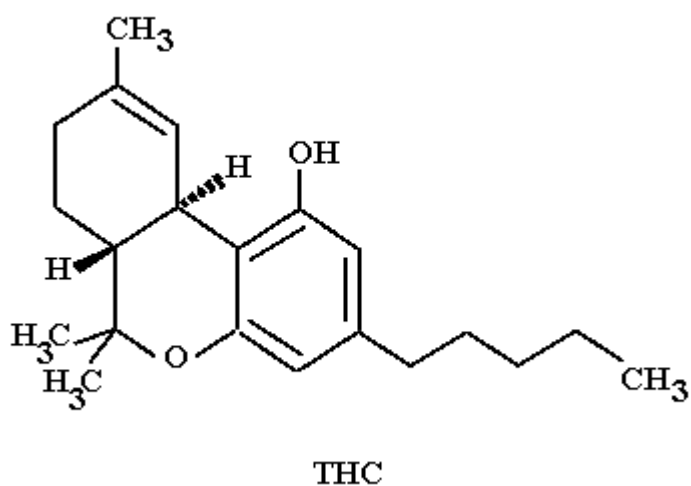
Nel sangue il Δ^9 -THC, a causa della sua lipofilia, si lega alle lipoproteine plasmatiche (α e β lipoproteine) e si accumula nei tessuti lipidici permanendo nell'organismo anche per diverse settimane.

Il metabolismo del THC avviene soprattutto nel fegato ad opera delle idrossilasi microsomiali e i principali metaboliti ossidrilici sono: l'11-

(OH)- Δ^9 -THC (molto piú attivo del Δ^9 -THC), l'8- α -(OH)- Δ^9 -THC, l'8- β -(OH)- Δ^9 -THC.

Altri metaboliti sono l'8-cheto- Δ^9 -THC, il 9-10-eossido- Δ^9 -THC e l'acido 11-nor-THC-9-carbossilico (THC-COOH; figura 3); quest'ultimo rappresenta il principale metabolita e la sua presenza in urina è essenziale per l'accertamento dell'abuso dei cannabinoidi.

Il picco massimo escretorio si raggiunge tra le 2 e le 6 ore; alcuni dati sperimentali indicano che non esiste una correlazione tra i livelli urinari dei metaboliti e gli effetti psicoattivi, per cui la quantità di THC e metaboliti in urina è indice solo di assunzione recente di cannabinoidi e non di uno stato di tossicodipendenza.²



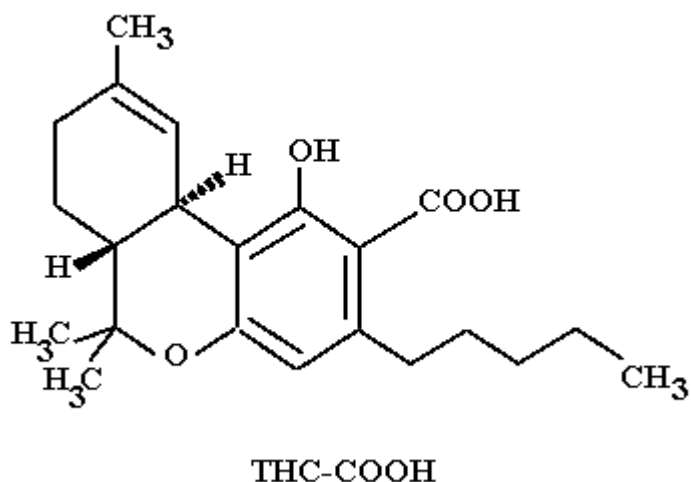


figura 3: Strutture molecolari del THC e THC-COOH

1.1.5 Oppiacei

Gli oppiacei rappresentano un gruppo di sostanze alcaloidi contenute nell'*oppio*, un essudato (lattice) secco di colore brunastro che si estrae dalle capsule verdi del *Papaver Somniferum*.

Le sostanze alcaloidi contenute nell'oppio fino ad oggi conosciute sono più di 25 e possono essere distinte in due categorie strutturali:

1. alcaloidi benzilisoquinolinici: come papaverina, narceina, noscapina; queste non hanno nessun tipo di attività stupefacente, ma possono avere attività farmacologica, come quella spasmolitica della papaverina.
2. alcaloidi fenantrenici: morfina (che costituisce circa il 10% dell'oppio), codeina, tebaina ecc.²

Attualmente si conoscono tre famiglie di oppioidi endogeni: le *endorfine*, le *encefaline*, le *dinorfine*; queste hanno fisiologicamente un ruolo chiave nell'aumento della soglia del dolore (ruolo che spiega l'effetto analgesico degli oppiacei) e nella regolazione dell'umore.

Sono stati identificati tre tipi di recettori degli oppioidi: μ , δ e κ , i quali presentano una concentrazione diversa in base alla localizzazione anatomica (principalmente midollo spinale, tronco cerebrale, locus coeruleus, diencefalo, telencefalo).

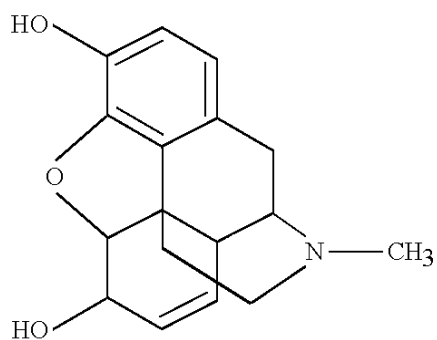
Le proprietà stupefacenti degli oppioidi appaiono legate soprattutto alla rispettiva capacità di agonismo col recettore μ che, frenando a livello della AVT la tonica inibizione esercitata da neuroni gabaergici sui neuroni dopaminergici, determina un cospicuo aumento, dose dipendente, della concentrazione extraneuronale di dopamina a livello del circuito mesolimbico di reward.² L'aumento di dopamina in queste aree del cervello è mediata dall'attivazione dei recettori μ e δ ed è responsabile dell'effetto euforizzante della morfina e dell'eroina (figura 4), mentre i recettori κ supportano l'analgesia e provocano disforia oltre che alterazioni delle secrezioni ormonali.

L'euforia (flash) indotta da oppiacei ha una durata variabile da 45 secondi a parecchi minuti; subentra quindi una fase di rilassamento e benessere intenso avente una durata di circa 1 ora.⁸

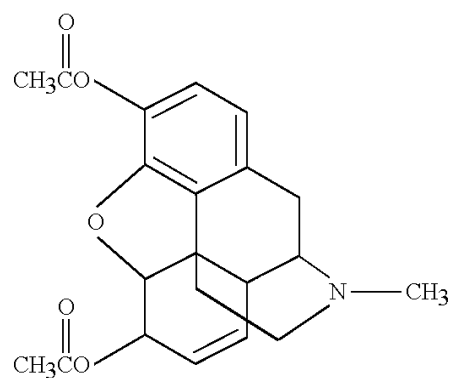
L'eroina si ottiene per esterificazione con anidride acetica dei gruppi polari idrossilici in posizione C₃ e C₆.³ L'introduzione di gruppi acetilici aumenta il grado di lipofilia della molecola, facilitando l'attraversamento della barriera ematoencefalica; di conseguenza, a parità di dose assunta, la concentrazione di sostanza attiva a livello risulta maggiore, rendendo l'uso di eroina a scopo voluttuario preferibile rispetto a quello della morfina stessa. Una volta in circolo l'eroina metabolizzata, principalmente a livello epatico, in 6-monoacetilmorfina (6-MAM; figura 4) per idrolisi del legame estereo in posizione 3, e poi a morfina per idrolisi di un ulteriore legame estereo in posizione 6. Morfina e 6-MAM sono i principi attivi responsabili dell'azione farmacologica dell'eroina stessa e risultano essere i principali metaboliti ritrovati nei liquidi biologici. In realtà, l'escrezione urinaria avviene per il 90% come morfina-glucuronato e solo nei primi minuti è possibile rilevare nel sangue il primo prodotto di idrolisi, cioè la 6-MAM.⁴

Un'ulteriore conferma dell'abuso di eroina può essere fornita dalla presenza di codeina. Quest'ultima infatti, è estratta dall'oppio come

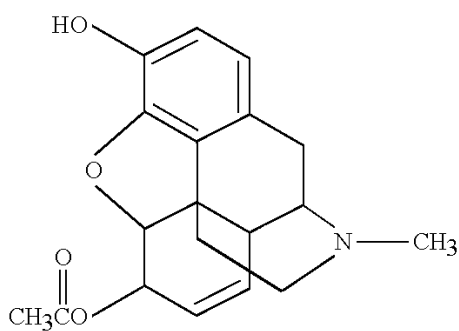
impurezza assieme alla morfina e, una volta assorbita, è metabolizzata ed escreta parzialmente nelle urine come sostanza immodificata.³



Morfina



Eroina



6-MAM

figura 4: Strutture molecolari di morfina, eroina, 6-MAM

1.2 Legislazione in ambito Nazionale

1.2.1 Classificazione sostanze stupefacenti

Il D.P.R. n. 309/90 “Testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza”⁹, stabilisce quali sono le sostanze stupefacenti o psicotrope sottoposte alla vigilanza ed al controllo del Ministero della Salute. Le sostanze in questione sono state raggruppate in due tabelle sviluppate in base agli effetti che le droghe hanno sull’organismo e alle conseguenze che un soggetto provoca nei riguardi della collettività, qualora le assumesse. In particolare in tabella 1 sono riportate tutte le sostanze definite stupefacenti e/o psicotrope, mentre la tabella 2, divisa in cinque sottotabelle, riporta i medicinali e/o i preparati aventi come principi attivi i composti elencati nella tabella 1.

In base all’art 14 del D.P.R. 309/90 le sostanze che rientrano nella tabella 1 sono:

1. *L’oppio* ed i materiali da cui possono essere ottenute le sostanze oppiacee naturali, estraibili dal *papaver somniferum*; gli alcaloidi ad azione narcotico-analgesica da esso estraibili; le sostanze ottenute per trasformazione chimica di quelle prima indicate; le sostanze ottenibili per sintesi che siano riconducibili, per struttura chimica o per effetti, a quelle oppiacee precedentemente indicate; eventuali importanti intermedi per la loro sintesi.

2. Le foglie di *coca* e gli alcaloidi ad azione eccitante sul sistema nervoso centrale da queste estraibili; le sostanze ad azione analoga ottenute per trasformazione chimica degli alcaloidi sopra indicati oppure per sintesi.

3. Le sostanze di tipo amfetaminico ad azione eccitante sul sistema nervoso centrale.

4. Ogni altra sostanza che produca effetti sul sistema nervoso centrale ed abbia capacità di determinare dipendenza fisica o psichica

dello stesso ordine o di ordine superiore a quelle precedentemente indicate.

5. Gli indolici, siano essi derivati triptaminici che lisergici, e i derivati feniletilamminici, che abbiano effetti allucinogeni o che possano provocare distorsioni sensoriali.

6. I tetraidrocannabinoli ed i loro analoghi.

7. Ogni altra sostanza naturale o sintetica che possa provocare allucinazioni o gravi distorsioni sensoriali.

8. Le preparazioni contenenti le sostanze di cui alla presente tabella.

1.2.2 Accertamenti con finalità tossicologico-forensi

Le analisi tossicologiche di sostanze stupefacenti orientate a varie finalità diagnostiche, possono avvalersi dell'esame di diversi campioni biologici (sangue, urina, capelli, saliva, sudore) che permettono da soli od in combinazione tra loro di esprimere diagnosi con valenza medico-legale.

La scelta della matrice da utilizzare è strettamente legata al tipo di informazione che si vuole ottenere e, di conseguenza, allo scopo legale di questa informazione. In linea di massima si usa il sangue per determinare una esposizione a droghe in atto, l'urina per determinare un uso anche saltuario, mentre la matrice cheratinica è la matrice di elezione nel caso si voglia determinare un uso abituale o una tossicodipendenza.

Le indagini tossicologico-forensi vengono applicate a svariate leggi:

- *Esecuzione della pena detentiva inflitta a persona tossicodipendente*

Fino dalla sua emanazione, all'art 95, il DPR 309/90⁹ ha previsto la necessità che la pena detentiva, nei confronti di persona condannata per reati commessi in relazione al proprio stato di tossicodipendenza, debba essere scontata in istituti idonei per lo svolgimento di programmi terapeutici e socio-riabilitativi.

I detenuti e gli internati hanno diritto, al pari dei cittadini in stato di libertà, alla erogazione delle prestazioni di prevenzione, diagnosi, cura e riabilitazione, efficaci ed appropriate, sulla base degli obiettivi generali e speciali di salute e dei livelli essenziali e uniformi di assistenza

individuati nel piano sanitario nazionale, nei piani sanitari regionali e in quelli locali.¹⁰

E' noto che il carcere, per molti aspetti, è causa di rischi aggiuntivi per la salute fisica e psichica dei tossicodipendenti detenuti, che costituiscono circa il 30% della popolazione carceraria. I programmi da sviluppare devono garantire la salute del tossicodipendente detenuto e assicurare, contemporaneamente, la tutela complessiva della salute all'interno delle strutture carcerarie, in un'ottica che concili le strategie più tipicamente terapeutiche con quelle di prevenzione e di riduzione del danno.

- *Idoneità alla guida*

È vietato guidare in condizioni di alterazione fisica e psichica correlata con l'uso di sostanze stupefacenti o psicotrope.

Chiunque guida in stato di alterazione psico-fisica dopo aver assunto sostanze stupefacenti o psicotrope secondo, l'art 187 del Dl.vo 30.4.1992 n. 285 e successive modificazioni^{11,12,13,14} è punito, in base alla gravità del reato con la sospensione o la revoca della patente di guida. Al comma 2 del suddetto Dl.vo si prescrive che gli organi di Polizia Stradale possono sottoporre i conducenti ad accertamenti qualitativi non invasivi o a prove, anche attraverso apparecchi portatili. In caso di esito positivo, tuttavia, è necessario effettuare esami volti ad accertare la presenza di sostanze stupefacenti o psicotrope, secondo uno specifico protocollo.¹⁵

- *Idoneità al servizio militare*

Per quanto previsto dall'art. 91 del D.P.R. 14 febbraio 1964 n. 237 e dal D.P.R. del 20 maggio 1964 n. 496 non sono ammessi ad eseguire il servizio militare le persone dedite all'uso di sostanze stupefacenti.¹⁶

- *Affidamento di minori*

La legge n. 54/2006¹⁷ regola l'affidamento dei figli minori in caso di separazione o divorzio dei coniugi, stabilendo, quale regola generale, l'affidamento congiunto dei minori in capo ad entrambi i genitori. Tuttavia all'art. 155 bis c.c., si prevede espressamente che il giudice possa disporre "l'affidamento dei figli ad uno solo dei genitori qualora ritenga con provvedimento motivato che l'affidamento all'altro sia contrario all'interesse del minore".

- *Imputabilità di reato*

L'art. 85 del Codice Penale¹⁸ recita: " Nessuno può essere punito per un fatto previsto dalla legge come reato se al momento in cui lo ha commesso non era imputabile; è imputabile colui che ha la capacità di intendere e volere". Nel nostro ordinamento la colpevolezza significa colpevolezza per un fatto, lesivo di un bene penalmente protetto, mentre per il soggetto agente occorre che sia certo che sia imputabile, ovvero che possa essere dichiarato penalmente responsabile. Le alterazioni patologiche, dovute all'azione di sostanze stupefacenti escludono o diminuiscono l'imputabilità.

- *Sicurezza sul lavoro*

Nel 1899 compaiono, nel nostro paese, i primi esempi legislativi di tutela della sicurezza sul lavoro. In quest'anno, infatti, sono stati emanati i Regii Decreti (RD) n. 230, 231 e 232 che prescrivono i regolamenti generali per la prevenzione di lavori a rischio quali quelli che prevedono l'utilizzo delle nuove macchine mosse da energia termica, meccanica e/o elettrica o quelli in cave e miniere e nelle industrie di esplosivi.

In particolare il Regio Decreto n. 231 del 18 Giugno 1899 prevedeva la non ammissibilità a lavori in cave e miniere per soggetti affetti da vertigini, sordità ed alcolismo, al fine di salvaguardare i lavoratori ed i compagni di lavoro verso un più elevato rischio infortunistico.^{19,20,21}

Successivamente, nel 1990 è stato emanato il D.P.R. n.3099, che all'art. 125 prevede l'espletamento di accertamenti in negativo, cioè di "assenza" di tossicodipendenza nei confronti di appartenenti alle categorie dei lavoratori (in assunzione o dipendenti, ovvero in corso di visita preventiva o periodica) destinati a mansioni che comportano rischi per la salute e incolumità altrui.

Tuttavia solo a partire dal 2007, con il Provvedimento della Conferenza Unificata n. 99 del 2007²², vengono definite in Allegato 1 le mansioni ritenute a rischio per l'incolumità di terzi; mentre la Conferenza Permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano del 2008²³ definisce in Allegato A le procedure operative per l'espletamento degli accertamenti previsti, tali procedure sono state recepite dalla Regione Campania con Deliberazione n. 1448 del 11 settembre 2009.²⁴

La suddetta normativa è finalizzata a garantire la tutela della sicurezza, incolumità e salute di terzi rispetto a danni che potrebbero derivare dall'esercizio improprio di particolari attività lavorative, quando ed in quanto effettuate da lavoratori in stato di tossicodipendenza.

1.3 Determinazione di sostanze d'abuso in matrici biologiche

La scelta di un opportuno biomarcatore, atto a rappresentare anche bassi livelli sostanza, si basa su un preliminare studio dei processi di assorbimento, distribuzione, trasformazione e di eliminazione dell'agente tossico stesso all'interno dell'organismo umano.

I meccanismi e le cinetiche di assorbimento, distribuzione ed eliminazione determinano le modalità con cui il campionamento deve essere effettuato o, in altri termini, consentono di stabilire quale matrice biologica analizzare (ad esempio sangue, urine o capelli) ed il periodo di raccolta o di prelievo del campione biologico.

Le tecniche analitiche che consentono di diagnosticare un eventuale uso di "droghe" da parte di un individuo si basano non solo sul dosaggio della "droga parente" ma anche dei suoi metaboliti. Infatti, la presenza della "droga parente" in un campione incognito potrebbe essere correlata ad eventuali contaminazioni esterne e dar luogo, quindi, a falsi positivi, mentre la determinazione dei metaboliti nelle matrici biologiche conferma l'assunzione effettiva della "droga" stessa.

Le analisi tossicologiche orientate a varie finalità diagnostiche, possono avvalersi dell'esame di diversi campioni biologici (sangue, urina, capelli, saliva, sudore) che permettono da soli od in combinazione tra loro di esprimere diagnosi con valenza medico-legale in più fattispecie.

1.3.1 Urina

L'urina è la matrice biologica di prima scelta nell'analisi delle sostanze d'abuso, soprattutto se si vuole dimostrare uno stato di assuntore cronico, per il quale vanno effettuati prelievi seriati a sorpresa. Il suo utilizzo presenta vantaggi quali:

- a) prelievo non invasivo
- b) possibilità di campionare grandi volumi
- c) possibilità di analizzare sia le sostanze che i metabolici anche a diversi giorni dall'assunzione.

Vi è da mettere in evidenza che le analisi delle sostanze d'abuso nelle urine possono solo dare un'indicazione della presenza o l'assenza di tale sostanza ad un definito valore soglia, ma non danno alcuna indicazione sulla quantità di sostanza assunta o sul momento dell'assunzione.

1.3.2 Sangue

Le indagini condotte su sangue possono dimostrare solo una esposizione relativamente recente (poche ore dopo l'assunzione) e le indagini tossicologiche per le quali si rende necessario dimostrare la "attualità" d'uso di sostanze illecite devono essere necessariamente eseguite su questa matrice. Il prelievo di questa matrice è invasivo, si ottengono volumi ridotti, ma ha il vantaggio che il sangue, al contrario dell'urina, non può essere soggetto a modificazione e/o adulterazioni.

1.3.3 Matrice cheratinica

Negli ultimi anni l'analisi dei capelli per la ricerca di farmaci e dei loro metaboliti ha ricevuto moltissima attenzione, soprattutto a causa dei vantaggi rispetto a liquidi biologici quali urine o siero. I farmaci e loro eventuali metaboliti rimangono all'interno del capello per un tempo indefinito, fornendo una finestra di rivelazione (da settimane a mesi) molto più ampia rispetto a quella nel siero o urine, in cui la quantità di farmaco diminuisce rapidamente in un periodo di tempo relativamente breve (da ore a giorni). Inoltre, la raccolta dei capelli è semplice, non invasiva e ripetibile per eventuali conferme sui risultati. Il capello è una matrice stabile indefinitivamente e molto difficile da manipolare al fine di adulterare il contenuto. Per questi motivi, la ricerca di sostanze stupefacenti nei capelli può essere utilizzata per provare un uso, un abuso o un misuso protratto nel tempo e per caratterizzarne l'intensità e

la sua storia in svariati casi riguardanti la tossicologia forense, quali: valutazione dell'idoneità alla guida, responsabilità criminale, affidamento della custodia dei minori.²⁵

L'impiego della matrice cheratinica in tossicologia forense è determinante sia per effettuare la cronologia dell'abuso delle sostanze note, sia per avere utili informazioni sulle abitudini drogastiche non note, al fine di poter ricostruire nel tempo lo stile di vita del soggetto indagato.

Il substrato delle matrici cheratiniche, tuttavia, non può fornire informazioni se l'uso di stupefacenti è del tutto occasionale e troppo sporadico, ma una abitudine d'uso anche solo settimanale è invece sempre rilevabile.²⁶

Le tecniche analitiche forensi per la determinazione di sostanze d'abuso in matrice cheratinica, richiedono l'adozione di un procedimento d'analisi in grado di correlare la positività del campione unicamente con l'assunzione dello stupefacente, scartando i campioni positivi per effetto di una contaminazione esterna o per assorbimento passivo.

I vantaggi sono:

- monitoraggio dei farmaci assunti
- non invasività del prelievo
- possibilità di differenziare consumatori leggeri, moderati e pesanti
- possibilità di individuare l'uso passato del farmaco con effetti collaterali ancora in atto
- difficoltà nell'adulterare la matrice

1.3.4 Incorporazione delle sostanze d'abuso in matrici cheratiniche

La presenza di sostanze stupefacenti nei capelli rappresenta il prodotto di una serie di fenomeni che coinvolgono la biologia e la biochimica del capello e che dipendono dalle proprietà chimico-fisiche delle diverse molecole con le quali l'organismo viene in contatto, in relazione ai processi di attraversamento delle membrane biologiche.

Il capello è una complessa struttura, formata da acqua, composti minerali, proteine fibrose (α e β cheratina), lipidi e melanina. Le "droghe" ed i metalli possono legarsi ai gruppi funzionali di questi componenti mediante deboli interazioni elettrostatiche, legami idrofobici e ionici.

Sono stati proposti diversi modelli teorici per spiegare l'incorporazione di xenobiotici nei capelli, sebbene quale sia il vero meccanismo non sia stato ancora provato. Un primo modello ipotizza che farmaci e sostanze d'abuso siano incorporati all'interno di "regioni" del capello direttamente a contatto con i capillari sanguigni a livello del bulbo pilifero durante l'istogenesi del capello. Quando poi il capello cresce, queste regioni diventerebbero inaccessibili all'ambiente esterno.

Un modello alternativo, che trova maggior consenso si basa sulla teoria di una minima incorporazione di xenobiotici dal circolo sanguigno a regioni del bulbo pilifero durante la formazione del capello. La maggior fonte di incorporazione proverrebbe dal contatto con xenobiotici contenuti nel sudore, ghiandole sebacee e dalla escrezione transdermica via strato corneo sia durante il processo di formazione del capello sia dopo che il capello è spuntato. Secondo questo ultimo modello non esisterebbero "regioni" inaccessibili all'ambiente esterno. Di fatto, è stato dimostrato che capelli immersi in soluzioni acquose contenenti cocaina, morfina o codeina, una volta analizzati per il contenuto di queste sostanze risultano "positivi" sebbene sottoposti ai normali processi di lavaggio eseguiti prima dell'analisi vera e propria. A conferma di ciò, il ruolo del sudore risulterebbe essere quello di un veicolo acquoso di xenobiotici.

Sebbene i due principali modelli teorici sopra esposti siano entrambi sufficienti per spiegare l'incorporazione di xenobiotici nei capelli, altri aspetti quali ad esempio: la presenza nel capello di un elevato rapporto farmaco parente/metabolita di sostanze ad emivita molto breve e chimicamente labili, la differente concentrazione di alcuni xenobiotici in capelli di diverso colore o di individui di razze differenti rimangono da chiarire. Un approccio biochimico che tiene conto delle varie proprietà chimico-fisiche dei capelli sembrerebbe fornire una spiegazione esaustiva alle variabili riscontrate nella matrice cheratinica.

Il concetto biochimico si basa su: principi di trasporto biologico attraverso membrane, principi di biotrasformazione, affinità di xenobiotici per la melanina. L'assorbimento di farmaci e sostanze d'abuso avverrebbe nel follicolo pilifero in crescita attraverso la membrana cellulare delle cellule della matrice, localizzate attorno alla papilla

vascolarizzata del follicolo, e la membrana cellulare dei melanociti, situati all'apice della papilla. E' noto che il trasporto attraverso le membrane dipende dalla grandezza e dalla forma di una molecola, dal suo legame con le proteine plasmatiche che ne limita la diffusione, dal suo coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua che ne indica la lipofilità e dal suo pKa, che per un dato pH ne determina la percentuale di forma nonionizzata che diffonde attraverso la membrana. Il punto isoelettrico delle fibre cheratinizzate del capello è circa 6.

Ciò indica la natura acida del capello e spiega l'incorporazione preferenziale delle sostanze di natura basica, favorita inoltre anche dal pH acido (range: 4,5-6,7) del sudore. Inoltre, i principi di trasporto attraverso le membrane spiegherebbero la maggiore concentrazione di farmaco (o sostanza d'abuso) parente rispetto al metabolita (o metaboliti) più idrofili. A conferma di ciò, alcuni autori hanno individuato uno scarso accumulo di metaboliti della cocaina (benzoilecgonina ed ecgonina metilestere) nella matrice cheratinica di animali trattati con i metaboliti stessi. Durante la cheratinizzazione, una volta che le cellule della matrice lasciano la regione del bulbo, sembrerebbe esclusa la diffusione delle sostanze inglobate verso la circolazione sistemica da cui provenivano, principalmente per un processo di deidratazione. Questo processo porterebbe ad una concentrazione di xenobiotici all'interno della cellula che, a causa di un alterato gradiente di concentrazione, comincerebbero a migrare verso l'esterno. L'ipotesi più verosimile è che alla fine del processo gli xenobiotici si concentrerebbero sulla membrana cellulare o negli spazi intercellulari. Un'altra possibilità è che gli xenobiotici una volta all'interno della cellula vengano catturati dai prodotti di differenziazione cellulare, quali proteine del filamento di cheratina o granuli di melanina. In questo ultimo caso, le sostanze si accumulerebbero sulla loro superficie poiché i polimeri della melanina tendono ad agire come "assorbenti biologici". I granuli di melanina sono prodotti all'interno dei melanociti, una popolazione cellulare altamente specializzata del follicolo, con un pH intracellulare nel range 3-5, il quale favorisce l'accumulo di sostanze di natura basica. Molti autori hanno dimostrato con studi *in vivo* ed *in vitro* l'affinità della melanina per vari farmaci e sostanze d'abuso. Sono state ipotizzate due possibili modalità

di legame tra xenobiotici e la melanina. Le sostanze con affinità per la melanina potrebbero legarsi alla melanoproteina durante la melanogenesi creando un gradiente di concentrazione e quindi un flusso all'interno dei melanociti piuttosto che verso le cellule della matrice, o potrebbero accumularsi sulla superficie dei granuli a causa della formazione di un complesso farmacomelanina. Questa teoria sarebbe confermata da molti studi nei quali si dimostra che la concentrazione di sostanze quali ad esempio aloperidolo, ofloxacina, cocaina, metadone è maggiore nei capelli con pigmentazione rispetto a quelli senza pigmentazione.

Resta da ricordare come esistano alcuni fattori capaci di influire sull'incorporazione degli xenobiotici nelle matrici cheratiniche e conseguentemente sulle concentrazioni delle sostanze stupefacenti eventualmente osservabili nelle matrici stesse, che possono complicare l'interpretazione dei risultati analitici. Fondamentalmente tali fattori sono imputabili alla razza [la melanina mostra una notevole capacità di fissare molecole di nostro interesse], alla contaminazione esterna [solo parzialmente ovviabile con accurato lavaggio] ad eventuali trattamenti cosmetici.^{27,28,29,30,31}

1.4 Rivelazione degli analiti

Importante principio scientifico e forense è la conferma della rilevazione di un analita. Di norma le procedure analitiche prevedono una prima fase di screening seguita da una successiva procedura di conferma, basata su principi chimico fisici diversi.

1.4.1 Test Iniziali (Screening)

Sono test che permettono di analizzare in tempi brevi numerosi campioni (solitamente urinari) in maniera economica, efficace e standardizzata.

Permettono di escludere, senza un ulteriore approfondimento diagnostico, i campioni negativi, identificando quelli che non contengono sostanze della classe in esame o quelli in cui la relativa concentrazione è al di sotto di un valore soglia definito *cut-off*.

1.4.2 Analisi di Conferma

Un campione risultato positivo nel test iniziale immunologico, se non verificato con un test di conferma cromatografico, può essere contestato e non ha valore medico-legale. Le analisi di conferma servono a verificare che non ci siano risultati falsi positivi dovuti alla non specificità dei test iniziali. In altri casi, invece, come ad esempio per la determinazione di sostanze stupefacenti nei capelli, l'analisi di conferma cromatografica non è preceduta da un test di screening. I test di conferma devono essere specifici per il singolo analita, per ovviare alla non specificità della maggior parte dei test immunologici che è per classi di sostanze, devono inoltre basarsi su principi chimico-fisici diversi da quelli dei test di primo livello. Devono avere sensibilità uguale o maggiore al valore soglia stabilito nei test di screening.

1.4.3 Cut-off analitico

Il cut-off può essere definito come il limite inferiore al di sotto del quale non è possibile avere l'assoluta certezza dell'avvenuta assunzione di una sostanza stupefacente. Pertanto il valore di cut-off permette di correlare inequivocabilmente la positività rilevata con l'effettiva assunzione.

Il valore di cut-off analitico dipende dalla tecnica, dalla strumentazione utilizzata, dal metodo analitico e dalle sue caratteristiche di accuratezza, precisione e sensibilità. L'introduzione dei valori di cut-off rende più efficace l'interpretazione dei dati analitici e consente di non incorrere in eventuali falsi positivi.

Bisogna precisare, inoltre, che i valori di cut-off variano a seconda del tipo di analisi (screening o conferma), della matrice che si vuole analizzare ed anche della finalità dell'analisi stessa.

In tabella 1 sono riportati i valori di cut-off utilizzati durante il presente lavoro di tesi.

Valori di cut-off nei capelli³²		
Classe di sostanze	Analiti da ricercare	(ng/mg)
<i>Oppiacei</i>	Morfina	0.2
	6-monoacetilmorfina	0.2
<i>Cocaina</i>	Cocaina	0.5
	Benzoilecgonina e/o altri metaboliti	0.05
<i>Amfetaminici</i>	Amfetamina, metamfetamina, MDA, MDMA	0.2
	MDMA	0.2
<i>Cannabinoidi</i>	THC	0.05
	THCCOOH	0.0002

Valori di cut-off nelle urine²⁴	
test di screening	
Classe di sostanza	ng/ml
<i>Oppiacei metaboliti</i>	300
<i>Cocaina metaboliti</i>	300
<i>Cannabinoidi (THC)</i>	50
<i>Amfetamina, Metamfetamina</i>	500
MDMA	500
<i>Metadone</i>	300
<i>Buprenorfina</i>	5

Analisi di conferma		
Classe di sostanze	Analiti da ricercare	(ng/ml)
<i>Oppiacei</i>	Morfina, 6-monoacetilmorfina, codeina	100
<i>Cocaina</i>	Cocaina, Benzoilecgonina, Ecgoninametilestere	100
<i>Cannabinoidi</i>	THCCOOH	15
<i>Metadone</i>	Metadone	100
<i>Amfetamina</i>	Amfetamina	250
<i>Metamfetamina</i>	Metamfetamina	250
MDMA	MDMA, MDA, MDEA	250
<i>Buprenorfina</i>	Buprenorfina	5

tabella 1: valori di cut-off analitici delle sostanze stupefacenti nei capelli e nelle urine

1.5 Droghe e lavoro

Il fenomeno dell'uso di droghe nei luoghi di lavoro risulta essere un problema spesso sottovalutato e sottostimato. Di fatto la maggior parte dei soggetti dediti al consumo di sostanze d'abuso sono soggetti in età

lavorativa, pertanto è importante verificare quali siano le problematiche lavorative connesse all'assunzione di tali sostanze. È necessario a tale proposito distinguere la condizione di tossicodipendenza dall'assunzione di sostanze d'abuso a scopo "ricreativo". Per quanto riguarda la condizione di tossicodipendenza, secondo un'indagine condotta dal settembre '98 al marzo '01 dal Dipartimento di Epidemiologia della Asl di Reggio-Emilia su 12 mila pazienti in cura con terapie sostitutive presso 200 SERT di 13 regioni, il 32% è occupato stabilmente, il 33% occasionalmente, mentre solo il 35% risulta disoccupato. Secondo un'indagine svolta nel 2000 e riferita ad un campione di 158 utenti dei Sert di Venezia e Mestre, il 62% dei soggetti che svolge un'attività lavorativa è operaio generico, il 21% è operaio specializzato, il 9% è commerciante, e l'8% è impiegato. Nella dipendenza da eroina la realtà più frequentemente osservata è quella di una compromissione della qualità della prestazione lavorativa ed è caratterizzata da una notevole difficoltà non tanto nel reperimento del lavoro, quanto piuttosto nel mantenimento dell'attività lavorativa stessa. Tale difficoltà è collegata agli effetti dell'eroina (o del metadone per i soggetti in trattamento con sostanze sostitutive) a livello del sistema nervoso centrale e periferico e a livello del sistema muscolare, con conseguente deficit dell'attenzione, della memoria e rallentamento psicomotorio. A ciò si sommano gli effetti sul piano mentale, quali frustrazione, difficoltà/incapacità di costruire relazioni, riduzione della tolleranza. Per quanto riguarda il consumo di altre sostanze psicoattive, da uno studio americano emerge che il 70-77% dei consumatori è stabilmente occupato in attività lavorative e che il 6.9% di tutta la popolazione lavorativa riferisce un consumo di droghe. Negli Stati Uniti sono stati effettuati una serie di studi allo scopo di valutare il consumo di sostanze illecite in alcune categorie professionali, in particolare tra gli operatori sanitari. Da tali studi emerge che il tasso di consumo di cocaina e marijuana tra il personale infermieristico è simile a quello della popolazione generale, con differenze significative, tuttavia, in relazione al reparto di appartenenza. E' emerso, in particolare, un maggiore consumo di marijuana o cocaina tra il personale medico e infermieristico dei reparti di terapia intensiva e di emergenza, mentre la pediatria e la medicina della comunità sono i reparti in cui, sulla base dei

dati anamnestici, sono stati registrati i livelli più bassi di consumo di sostanze psicoattive tra gli operatori sanitari. Il problema principale che ci si trova ad affrontare in merito al consumo di sostanze psicoattive, è che si tratta nella maggior parte dei casi di droghe usate a scopo “ricreativo” e la cui assunzione spesso è limitata al fine settimana. È pertanto lecito chiedersi quali possono essere le conseguenze sull’attività lavorativa legate all’assunzione di droghe al di fuori dei giorni lavorativi.

I principali aspetti discussi in letteratura a tale proposito sono sostanzialmente i seguenti:

1) Riduzione della performance lavorativa, riconducibile a condizione di stanchezza diffusa, apatia, sonnolenza, diminuzione della concentrazione, bruciore agli occhi.

2) Aumento del rischio di infortuni nelle attività lavorative pericolose e che richiedono attenzione (es. guida di veicoli). L’uso di droghe può essere collocato tra i fattori soggettivi (umani) causa di infortuni sul lavoro, perché riducono l’integrità psicofisica con conseguente alterazione dei tempi di reazione e riduzione della percezione del pericolo in ambito lavorativo. In particolare per quanto riguarda l’“ecstasy”, oltre al notevole affaticamento fisico, sono possibili flash psicotici anche a mesi di distanza dall’ultima assunzione.

3) Assenteismo. È il principale indice di performance lavorativa per il quale esiste una consistente differenza tra consumatori e non consumatori di sostanze psicoattive. L’assenteismo può essere in parte ricondotto agli effetti che l’uso di sostanze d’abuso determina sul piano fisico-clinico; ad es. in soggetti forti fumatori di marijuana si osserva un’aumentata frequenza di episodi di bronchite acuta.

1.5.1 Procedure Operative: accertamenti di primo livello

L’iter procedurale per gli accertamenti di assenza d’uso di sostanze stupefacenti in lavoratori con mansioni a rischio, si compone di due macrofasi: un primo livello di accertamenti da parte del medico competente ed un secondo livello di approfondimento diagnostico-accertativo a carico delle strutture sanitarie competenti.

Le procedure accertative di primo livello, da parte del medico competente, riguardano i lavoratori che svolgono le mansioni descritte in tabella 2 e devono essere eseguite: pre-affidamento della mansione, periodicamente (con frequenza annuale), per ragionevole dubbio, dopo un incidente, prima del rientro nella mansione a rischio dopo esito positivo per assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope. Nel corso degli accertamenti di primo livello deve essere effettuata una visita medica, orientata all'identificazione di segni e sintomi suggestivi di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope. Contestualmente a tale visita, il medico competente dovrà effettuare un test tossicologico-analitico di screening o effettuare la raccolta di un campione di urina, che sarà inviato presso idonee strutture laboratoristiche autorizzate, per l'esecuzione del test stesso. I metodi analitici di screening si basano su tecniche immunochimiche rapide, e devono rispettare le concentrazioni di cut-off stabilite nell'Accordo, nonché fornire una registrazione oggettiva a stampa dei risultati.

In caso di positività ai test di screening bisogna effettuare sullo stesso campione urinario un'ulteriore analisi con tecniche che utilizzano principi fisici diversi dai test immunochimici e che abbiano maggiore specificità e sensibilità. Tale analisi di conferma deve essere eseguita mediante cromatografia accoppiata a spettrometria di massa con valori di soglia prescritti dalla legge (tabella 1) ed è finalizzata a confermare la presenza degli analiti trovati nei test di screening.

Le procedure operative, oltre ad indicare il tipo di analisi da eseguire su ogni campione, danno indicazione, anche, dei modi in cui il prelievo deve essere effettuato, del trasporto dei campioni alle strutture competenti, della conservazione e distruzione dei campioni, nonché di tutta la documentazione necessaria.

Attività per le quali è richiesto un certificato di abilitazione per l'espletamento dei seguenti lavori pericolosi:	
a)	impiego di gas tossici
b)	fabbricazione e uso di fuochi di artificio e posizionamento e brillamento mine
c)	direzione tecnica e conduzione di impianti nucleari
Mansioni inerenti le attività di trasporto:	
a)	conducenti di veicoli stradali per i quali e' richiesto il possesso della patente di guida categoria C, D, E, e quelli per i quali e' richiesto il certificato di abilitazione professionale per la guida di taxi o di veicoli in servizio di noleggio con conducente, ovvero il certificato di formazione professionale per guida di veicoli che trasportano merci pericolose su strada
b)	personale addetto direttamente alla circolazione dei treni e alla sicurezza dell'esercizio ferroviario che espliciti attività di condotta, verifica materiale rotabile, manovra apparati di sicurezza, formazione treni, accompagnamento treni, gestione della circolazione, manutenzione infrastruttura e coordinamento e vigilanza di una o più attività di sicurezza
c)	personale ferroviario navigante sulle navi del gestore dell'infrastruttura ferroviaria con esclusione del personale di camera e di mensa
d)	personale navigante delle acque interne con qualifica di conduttore per le imbarcazioni da diporto adibite a noleggio
e)	personale addetto alla circolazione e a sicurezza delle ferrovie in concessione e in gestione governativa, metropolitane, tranvie e impianti assimilati, filovie, autolinee e impianti funicolari, aerei e terrestri
f)	conducenti, conduttori, manovratori e addetti agli scambi di altri veicoli con binario, rotaie o di apparecchi di sollevamento, esclusi i manovratori di carri ponte con pulsantiera a terra e di monorotaie
g)	personale marittimo di prima categoria delle sezioni di coperta e macchina, limitatamente allo Stato maggiore e sottufficiali componenti l'equipaggio di navi mercantili e passeggeri, nonché il personale marittimo e tecnico delle piattaforme in mare, dei pontoni galleggianti, adibito ad attività off-shore e delle navi posatubi
h)	controllori di volo ed esperti di assistenza al volo
i)	personale certificato dal registro aeronautico italiano
l)	collaudatori di mezzi di navigazione marittima, terrestre ed aerea
m)	addetti ai pannelli di controllo del movimento nel settore dei trasporti
n)	addetti alla guida di macchine di movimentazione terra e merci.
Funzioni operative proprie degli addetti e dei responsabili della produzione, del confezionamento, della detenzione, del trasporto e della vendita di esplosivi	

tabella 2: Mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute dei terzi

1.6 Catena di Custodia

La validità dei risultati di laboratorio, in caso di indagini con validità medico-legale, non dipende solo dall'adeguatezza del processo analitico ma anche dalla prova dell'integrità del campione, dal momento in cui è stato raccolto fino a quando l'analisi è completata ed il campione distrutto.

La Catena di Custodia è l'insieme delle procedure documentate da adottare in tutte le fasi di lavorazione previste nell'analisi dei campioni nonché di tutta la documentazione che accompagna il campione e che riporta notizie sul prelievo, trasporto e conservazione.

L'obiettivo della catena di custodia è ricostruire l'iter del prelevato fin dalla raccolta, seguendo le date gli orari e le firme del personale che lo ha preso in carico di volta in volta.

1.7 Tecniche analitiche

1.7.1 Parametri di Validazione del Dato Analitico

La "validazione" di un metodo analitico consiste in una raccolta di dati sperimentali allo scopo di dimostrare l'adeguatezza e l'attendibilità della procedura analitica adoperata per identificare e/o quantificare una sostanza di interesse. In altre parole, affinché i risultati forniti dall'analisi di un campione incognito, mediante l'applicazione di una specifica procedura analitica, siano accreditati e abbiano validità generale, indipendentemente dal laboratorio di analisi, la procedura analitica adoperata deve soddisfare specifici requisiti (parametri di validazione), i quali attestano, appunto, la "bontà" dell'analisi.

Il protocollo di validazione prevede, quindi, l'effettuazione di una serie di esperimenti tesi a valutare sensibilità, specificità, precisione e accuratezza della tecnica analitica in esame, verificando in tal modo il rispetto dei requisiti richiesti.

DEFINIZIONI:

• *Riproducibilità e ripetibilità*: un metodo è considerato riproducibile se effettuando analisi più volte, con la stessa tecnica e le medesime condizioni operative, si ottiene un esito identico (nell'ambito dell'incertezza di misura). Per ripetibile si intende un'analisi che, pur eseguita con strumentazioni analoghe, analisti e laboratori differenti fornisce un risultato finale, comunque, equivalente.

• *Selettività o Specificità*: Capacità del metodo bioanalitico di discriminare gli analiti da sostanze eventualmente presenti nella matrice complessa, quali metaboliti, impurezze o componenti generiche della matrice stessa. Per la sua determinazione è necessario analizzare campioni bianchi (a controllo negativo) dell'opportuna matrice al fine di individuare eventuali interferenze.

• *Limite di sensibilità e di quantificazione*: il limite di sensibilità di un metodo indica la quantità minima di analita che si riesce a rilevare con la metodica scelta; il limite di quantificazione è la minima concentrazione di analita quantificabile.

Il limite di sensibilità e il limite di quantificazione sono calcolati attraverso analisi ripetute di campioni costituiti dalla matrice del campione reale addizionata unicamente dello standard interno.

• *Precisione e accuratezza*: il parametro "precisione" è connesso al concetto di riproducibilità analitica. La precisione indica la concordanza tra risultati di misure relative allo stesso campione o a campioni analoghi ottenute mediante analisi condotte lo stesso giorno o in giorni diversi. Il parametro si valuta attraverso la determinazione della deviazione standard (SD) e del coefficiente di variazione (CV%), il quale è un indice percentuale che correla l'errore della misura al valore medio di concentrazione ottenuto durante le analisi.

$$SD = [(\sum x_i - X_m)^2 / (N-1)]^{1/2} = \text{deviazione standard}$$

$$CV\% = SD / X_m \times 100 = \text{coefficiente di variazione}$$

L'accuratezza descrive quanto la media dei risultati ottenuti sia prossima al valore vero (teorico). Essa si determina analizzando campioni con quantità note di analita: il valore di concentrazione ottenuto dall'analisi si confronta poi con quello vero (nominale), valutando percentualmente di quanto da esso si discosta, secondo la seguente formula:

$$(C_{\text{NOM}} - C_{\text{MIS}}) / C_{\text{NOM}} * 100$$

C_{NOM} = Concentrazione nominale

C_{MIS} = Concentrazione Misurata

Sia la precisione che l'accuratezza devono rientrare nel 15% per tutti i livelli di concentrazione tranne che per il cut-off i cui valori di precisione ed accuratezza devono rientrare nel 20% rispetto al valore nominale.³³

- *Recupero*: la percentuale di recupero (Rec%) è un indice dell'efficienza della procedura di estrazione dell'analita dalla matrice. Essa è stata valutata paragonando la risposta analitica ottenuta per tre campioni a tre diverse concentrazioni estratti dalla matrice, con la risposta ottenuta per le corrispondenti soluzioni standard (che rappresentano un recupero del 100%).

- *Stabilità*: è necessario considerare la stabilità della sostanza durante tutte le fasi della sua manipolazione, ossia nelle condizioni di conservazione sia a lungo termine (temperatura di congelamento) che a breve termine (temperatura della stanza in cui si lavora). Le condizioni per la valutazione delle stabilità devono rispecchiare effettivamente la reale situazione in cui si trova il campione durante le fasi di manipolazione e di analisi.³³

1.7.2 Estrazione in fase solida (SPE)

L'estrazione in fase solida è un'estrazione per adsorbimento, un processo fisico tra una fase solida e una liquida, in cui la fase solida ha un'affinità maggiore per il composto da isolare rispetto al solvente in cui lo stesso composto è sciolto. Quando il campione passa attraverso la fase

solida, impaccata all'interno di una cartuccia, gli analiti vengono concentrati sulla superficie del materiale adsorbente mentre gli altri composti presenti nel campione fluiscono senza interagire, ne consegue la purificazione e la materiale concentrazione degli analiti nella fase adsorbente.

L'adsorbimento si ottiene per interazioni specifiche tra i gruppi funzionali dei composti e il substrato della fase solida.

Nella fase di eluizione si rimuovono le sostanze isolate mediante il passaggio in cartuccia di un opportuno solvente, da usare nel minor volume possibile. Maggiore è l'interazione tra fase adsorbente ed analita, minore è il rischio che questo sia eliminato dalla cartuccia durante le fasi di lavaggio, utilizzate per eliminare molecole interferenti eventualmente presenti nel campione.

Tra gli adsorbenti più utilizzati vi sono quelli silicei, prodotti mediante reazione tra organosilani e silicati attivi. Questi sono materiali rigidi, non rigonfiano in presenza del solvente e ciò permette l'uso successivo di diversi solventi rendendo possibili estrazioni anche molto complesse. Le proprietà di ritenzione degli adsorbenti silicei sono dovute soprattutto ai gruppi funzionali legati al substrato di silice, alla polarità del substrato e ai silanoli rimasti liberi sulla sua superficie. C₁₈ (octadecil-silano) è l'adsorbente più utilizzato per le interazioni non polari, non è selettivo e permette di trattenere molti composti non polari.

Le interazioni non polari più importanti che possono intercorrere tra fase adsorbente e analita sono forze di Van der Waals.

1.7.3 Head Space/Solid Phase Microextraction (SPME)

La microestrazione in fase solida è una tecnica nella quale vengono utilizzati piccoli segmenti di fibre di silice fusa ricoperte di un opportuno materiale per estrarre sostanze volatili e semivolatili da varie matrici.

Essa si basa sulla ripartizione dell'analita tra il campione (soluzione acquosa o matrici solide) ed il polimero che riveste la fibra di silice fusa oppure, nel caso di analisi per spazio di testa, tiene conto degli equilibri che si instaurano tra l'analita nel campione, la fase vapore sovrastante il campione ed il polimero che ricopre la fibra.

Ponendo, infatti, un fluido biologico contenente sostanze volatili da estrarre in vials a tenuta e scaldando quest'ultimo mediante un bagno termostatico, la concentrazione degli analiti nella fase vapore sovrastante il liquido (spazio di testa) aumenta notevolmente a seguito dell'equilibrio di ripartizione degli analiti stessi tra la fase liquida e la fase vapore (*legge di Henry*) e al variare della temperatura del bagno termostatico e del tempo necessario a raggiungere l'equilibrio. Successivamente la fase vapore viene prelevata ed iniettata in un gas cromatografo per la rivelazione degli analiti.

La fase di estrazione degli analiti dalla matrice biologica coincide con la purificazione del campione da analizzare, in quanto solo sostanze volatili arricchiscono lo 'spazio di testa'. Inoltre, nel caso di sostanze lipofile, a parità di temperatura del bagno termostatico (temperatura di equilibrio) un aumento della polarità della soluzione biologica iniziale, mediante ad esempio l'aggiunta di sale, sposta l'equilibrio a favore della fase vapore.

L'inserimento di una fibra rivestita chimicamente nello spazio di testa sovrastante un campione consente di concentrare i composti volatili inizialmente contenuti nel campione liquido. In condizioni controllate (tempo e temperatura di contatto fra la fibra e la fase vapore), infatti, i composti chimici presenti nel campione vengono estratti e depositati sul rivestimento della fibra stessa, assistendo ad una ulteriore fase di estrazione e purificazione degli analiti e garantendo riproducibilità alla tecnica di iniezione nel gas cromatografo.

Il passo successivo riguarda il desorbimento della fibra nel foro di iniezione a caldo di un sistema di GC o GC/MS, per la relativa analisi.

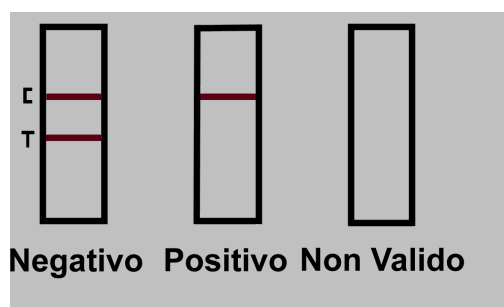
1.7.4 Analisi di screening e analisi di conferma

L'*urina* è la matrice di scelta per lo screening e l'identificazione di sostanze sconosciute poiché è disponibile in maniera non invasiva, in quantità abbondante e contiene concentrazioni di droghe relativamente elevate.

L'accertamento tossicologico-analitico di sostanze stupefacenti, effettuato su matrice urinaria, prevede preliminarmente un test di screening e in caso di positività, un test di conferma.

I test di screening si basano su metodiche immunochimiche, dotate di elevata sensibilità, velocità d'analisi e non necessitano di pretrattamento del campione. La notevole sensibilità di quest'analisi esclude o riduce notevolmente l'evenienza di falsi negativi, ma non quella di falsi positivi. Il grande limite, infatti, dei metodi immunochimici è quella di basarsi su reazioni antigene-anticorpo che presentano una specificità di gruppo non assoluta, per cui possono originarsi delle cross-reaction con altre sostanze o farmaci eventualmente assunti. Il principio sul quale si basano i test di screening è il legame competitivo. Le droghe che possono essere presenti nell'urina competono con il relativo coniugato per i medesimi siti di legame dell'anticorpo. Quando si effettua il test un campione di urina migra lungo la membrana per capillarità, e se è presente una droga a concentrazione inferiore al proprio cut-off, non saturerà tutti i siti di legame delle particelle legate agli anticorpi presenti nella striscia. Le particelle legate agli anticorpi saranno catturate dal coniugato immobilizzato ed una banda colorata comparirà nella zona del risultato del test. Questa banda non si formerà se il livello della droga sarà superiore al proprio cut-off, poiché i siti dei legami dei relativi anticorpi saranno saturati (figura 5).

Tramite questo test si hanno dati analitici preliminari quindi per avere dati più specifici è necessario ricorrere alla gas cromatografia (GC) e alla spettrometria di massa (MS).



Negativo: compaiono due bande colorate (generalmente di colore rosastro), una in corrispondenza della zona di controllo (C) e una seconda linea in corrispondenza della zona reattiva (T). Il risultato negativo indica che la concentrazione della droga nell'urina è al di sotto

del cut-off rilevabile. Va considerato negativo anche quando si presenta una debole banda colorata (comunque visibile).

Positivo: compare una sola banda colorata (generalmente di colore rosastro), in corrispondenza della zona di controllo (C). Il risultato positivo indica che la concentrazione della droga nell'urina è superiore al cut-off rilevabile.

Non Valido: Non compare la banda colorata nella zona di controllo (C) anche se compare la banda in corrispondenza della zona reattiva (T). Il test deve essere ripetuto.

figura 5: interpretazione dei risultati nei test di screening

Un campione risultato positivo nel test iniziale immunologico, se non verificato con un test di conferma cromatografico, può essere contestato e non ha valore medico-legale. Le analisi di conferma servono a verificare che non ci siano risultati falsi positivi dovuti alla non specificità dei test iniziali. I test di conferma devono essere specifici per il singolo analita, per ovviare alla non specificità della maggior parte dei test immunologici che è per classi di sostanze, devono, inoltre, basarsi su principi chimici e fisici diversi da quelli dei test di primo livello e devono avere sensibilità uguale o maggiore al valore soglia stabilito nei test di primo livello.

1.7.5 Gas Cromatografia

La cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa, grazie alle sue caratteristiche di elevata sensibilità e specificità, è la tecnica di elezione sia per le analisi di conferma di test immunochimici in urina, sia per la determinazione di sostanze stupefacenti in matrice cheratinica. La gas-cromatografia è una tecnica separativa ad alto potere risolutivo che consente la separazione di sostanze presenti in miscele complesse in base a proprietà chimico-fisiche quali temperatura di ebollizione e polarità delle molecole.

L'analisi gas-cromatografica è condotta utilizzando una fase stazionaria solida o liquida (adsorbita su un supporto solido) e un gas inerte (generalmente elio o azoto), quale gas di trasporto. Al variare della temperatura, ogni componente della miscela si ripartisce in maniera differente tra la fase stazionaria e la fase vapore e viene dunque eluito in tempi diversi.

Il tempo che intercorre tra l'introduzione del campione in colonna e la massima risposta del rivelatore è definito tempo di ritenzione (RT) ed è caratteristico di ogni sostanza.

Un campione può essere introdotto in un gas-cromatografo mediante le tecniche *on-column*, che prevede che il campione sia iniettato direttamente in colonna oppure attraverso un iniettore *split/splitless* riscaldato, con cui il campione è iniettato attraverso un setto all'interno di un liner di quarzo posto ad una temperatura solitamente compresa fra 220° e 270°C. In entrambi i casi la temperatura elevata risulta necessaria per la vaporizzazione del campione. La miscela arriva alla colonna capillare, posta all'interno del forno, direttamente o attraverso il liner, e i suoi componenti sono separati, eluendo in tempi diversi. I parametri che influenzano la separazione cromatografica di una miscela dipendono, oltre che dalla natura chimico-fisica di ciascuna sostanza, dalla fase stazionaria, dalle dimensioni della colonna capillare, dal flusso del gas di trasporto e dal gradiente di temperatura utilizzato.

1.7.6 Spettrometria di Massa

La spettrometria di massa consente di misurare il rapporto massa/carica (m/z) dell'analita e, quindi, di ricavare informazioni riguardanti la composizione elementare e di determinare la struttura della sostanza in esame o procedere ad un'accurata analisi quantitativa. Tale tecnica è sensibile, specifica e di elevata riproducibilità. Inoltre, messo a punto il metodo analitico, la procedura può essere applicata nelle analisi di routine.

La spettrometria di massa si basa sulla ionizzazione e successiva frammentazione delle molecole, e sulla separazione degli ioni generati (in fase gassosa e sottoposti ad un campo elettromagnetico in condizioni di vuoto spinto) mediante opportuni analizzatori, tra cui il singolo quadrupolo e la trappola ionica.

Il processo di ionizzazione avviene solitamente all'interno della sorgente dello spettrometro di massa e può essere realizzato mediante varie tecniche, tra cui la più comune e di facile utilizzo è la ionizzazione elettronica (EI), in base alla quale le molecole sono bombardate da un

fascio di elettroni emessi da un filamento di tungsteno riscaldato; l'energia fornita dall'urto con gli elettroni causa la ionizzazione e la frammentazione delle molecole, dando luogo alla formazione di ioni.

Successivamente, gli ioni vengono focalizzati ed indirizzati verso una regione dello spettrometro di massa chiamata analizzatore, nel quale gli ioni prodotti in sorgente vengono separati grazie ad un campo magnetico in base al loro rapporto m/z . Ogni ione corrispondente ad un determinato valore di m/z genera una corrente ionica che viene acquisita e registrata, dando luogo allo spettro di massa.

Ciascuna sostanza si ionizza e si frammenta secondo regole ben precise, che dipendono dalla struttura della molecola stessa e pertanto, mostra uno spettro di massa caratteristico, definito "impronta digitale", in quanto, in base ai valori di m/z e alle intensità relative dei frammenti ionici che derivano dal processo di ionizzazione elettronica, identifica univocamente una sostanza.

1.7.7 Modalità di acquisizione Full Scan e SIM

I metodi di acquisizione che si possono scegliere nella spettrometria di massa sono diversi a seconda del tipo di analisi che si vuole effettuare (qualitativa o quantitativa) e della specificità e sensibilità che si vuole ottenere.

I dati di uno spettro di massa *full scan* di una sostanza derivano dall'acquisizione del segnale relativo a tutti gli ioni generati nella camera di ionizzazione dalla sostanza nel range di valori di m/z selezionato per l'analisi, e consente di effettuare indagini qualitative tese all'identificazione e all'individuazione di sostanze incognite.

In un'analisi *full scan* lo spettrometro esegue in sequenza l'acquisizione di una serie di spettri di massa, opera cioè, una scansione ripetuta nell'intervallo di valori di m/z impostato e ogni singola scansione rappresenta uno spettro di massa, in cui in ascissa è posto il rapporto m/z e in ordinata l'abbondanza relativa dei vari segnali, ognuno dei quali si riferisce ad un frammento o ione.

Nel caso in cui si debbano effettuare analisi quantitative, è possibile ottenere una maggiore sensibilità quando, nel corso dell'analisi, è

riportato in diagramma solo la corrente ionica dovuta ai ioni specifici che caratterizzano la sostanza in esame, operando, cioè, una Scansione di Ioni Selezionati (Selected Ion Monitoring, SIM). La selezione e l'acquisizione soltanto di pochi ioni rappresentativi dell'analita d'interesse comportano, infatti, una diminuzione del segnale dovuto al rumore di fondo e, di conseguenza, un aumento del rapporto segnale/rumore e, quindi, una migliore sensibilità nella rilevazione degli analiti, specialmente nel caso di matrici complesse, senza tuttavia perdere in specificità. Quest'ultima, infatti, è garantita anche dalla misura delle intensità relative dei frammenti acquisiti: allo scopo di garantire un'identificazione univoca della molecola in esame, le intensità relative dei frammenti ionici devono rispecchiare, entro un parametro di tolleranza del 5%, le abbondanze relative tipiche della molecola, che si ritrovano nella "impronta digitale" della sostanza, cioè, nel corrispondente spettro di massa *full scan*.

1.7.8 Gas-cromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa

Solitamente l'eluizione dalla colonna cromatografica è monitorata mediante rivelatori a ionizzazione di fiamma e le sostanze eluite vengono identificate unicamente in base ai relativi tempi di ritenzione (intervallo tra iniezione del campione e punto di massima risposta del rivelatore).

L'utilizzo, come sistema di rilevazione, di uno spettrometro di massa direttamente collegato ad un gas-cromatografo, consente invece di identificare univocamente ciascuna sostanza, non solo in base al tempo di ritenzione ma anche mediante il relativo spettro di massa, che costituisce "l'impronta digitale" della sostanza stessa.

La spettrometria di massa si basa sulla rivelazione di ioni in fase gassosa in condizioni di vuoto spinto; pertanto, l'accoppiamento con un gas cromatografo (GC/MS), che già prevede campioni in fase gassosa, si realizza facilmente, attraverso l'utilizzo di dispositivi (transfer line) capaci di ridurre il flusso del gas di trasporto prima che sia raggiunta la sorgente di ionizzazione.

L'abbondanza dei vari ioni in ogni spettro di massa può essere sommata, e questa somma, riportata sequenzialmente in diagramma in

funzione del tempo, fornisce il cromatogramma della corrente ionica totale (TIC, Total Ion Current), il cui aspetto è del tutto analogo a quello ottenuto mediante un qualsiasi rivelatore convenzionale. Ogni picco cromatografico, quindi, rappresenta generalmente un unico analita, che può essere identificato mediante l'interpretazione dello spettro di massa relativo.

1.7.9 Principi di derivatizzazione

La derivatizzazione è un processo mediante il quale diverse reazioni come la metilazione, la silanizzazione, l'acetilazione e la trifluoroacetil-n-butilazione vengono sfruttate per aumentare la volatilità dei composti che si vogliono analizzare mediante gascromatografia.

In molti farmaci e relativi metaboliti, i gruppi funzionali suscettibili a derivatizzazione, sono idrossili, chetoni, acidi carbossilici e ammine. La scelta dei derivati da usare dipende da molti fattori:

- il tipo di ionizzazione adottato dallo spettrometro di massa (di solito EI o CI)
- la risoluzione dello spettrometro di massa, specialmente quando si vuole separare l'analita da molte interferenze biologiche di "background"
- la possibilità di aumentare la selettività spettrometrica, usando la tandem-MS (o MS-MS)

L'analisi GC può essere effettuata su composti volatili e con una certa stabilità termica, perciò la derivatizzazione è d'obbligo per composti polari e termolabili, poiché li rende adatti per la GC.

La riduzione della polarità può migliorare le proprietà gascromatografiche del composto, minimizzando l'adsorbimento nella colonna (indesiderabile e non specifico) e permettendo l'ottenimento di migliori forme dei picchi.

La struttura chimica della sostanza cambia dopo la derivatizzazione, perciò il pattern di frammentazione può essere praticamente modificato.

Le principali caratteristiche di una buona derivatizzazione sono:

- formazione di un solo derivato per ogni composto
- reazione semplice e veloce

- condizioni di reazione blande
- resa alta e riproducibile
- stabilità nel mezzo di reazione
- curva di calibrazione lineare (per analisi quantitative)

1.7.10 Metodi di quantificazione

L'analisi quantitativa, condotta allo scopo di effettuare un monitoraggio biologico, consiste nella determinazione della concentrazione di un determinato biomarcatore nel fluido biologico preso in esame.

La determinazione quantitativa necessita di soluzioni a titolo noto di analita in grado di simulare nei minimi dettagli le condizioni relative ad un campionamento reale. Di conseguenza si preparano e si analizzano campioni urinari contenenti quantità note e variabili di analita e quantità note e costanti di un appropriato standard interno (IS). Tali campioni vengono analizzati mediante GC/MS, misurando, per ogni analisi, il rapporto tra le aree dei picchi cromatografici dell'analita e dello standard interno adoperato.

La quantificazione avviene confrontando i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni reali con quelli corrispondenti ai campioni a titolo noto. Tale raffronto può essere eseguito adoperando diverse metodiche di quantificazione, tra cui le curve di calibrazione.

1.7.11 Standard Interno

L'utilizzo di una molecola quale standard interno rende i risultati di analisi, condotte in più stadi (campionamento, conservazione del campione, estrazione degli analiti e rilevazione GC/MS-SIM), indipendenti da eventuali errori di diluizione, da variazioni del volume di campione introdotto nello strumento di analisi, dal recupero di estrazione o da eventuali perdite di campione durante le varie fasi analitiche.

L'indipendenza da tutti questi fattori deriva dal fatto che la quantificazione si basa su misure relative e cioè sulla misura del rapporto tra l'area dell'analita e quella dello standard interno.

Sostanze deuterate, con caratteristiche chimico-fisiche identiche a quelle degli analiti di interesse (temperatura di ebollizione, coefficienti di ripartizione, lipofilia, risposta all'analisi GC/MS ecc.) rappresentano gli standard interni ideali in quanto vengono estratti, purificati e rivelati in modo del tutto analogo alle molecole in esame, garantendo così un'estrema riproducibilità analitica.

1.7.12 Curve di calibrazione

Le rette di calibrazione vengono costruite analizzando campioni contenenti quantità note e variabili di analita e quantità note e costanti di standard interno.

I risultati si riportano in diagramma: sull'asse delle ascisse si pone la concentrazione dell'analita; sull'asse delle ordinate il rapporto tra le aree dei picchi cromatografici relativi all'analita ed allo standard interno. Qualora la risposta strumentale risulti lineare nel range di concentrazioni preso in esame, l'interpolazione dei dati comporta la formulazione dell'equazione di una retta di taratura, con un coefficiente di correlazione prossimo all'unità.

La concentrazione degli analiti nei campioni reali viene calcolata inserendo il valore del rapporto tra le aree dei picchi cromatografici dell'analita e dello standard interno (valore misurato mediante l'analisi) nell'equazione della curva di calibrazione: la concentrazione dell'analita nel campione incognito è data dal valore della x.

1.8 Scopo del progetto di tesi

L'attività di ricerca svolta e di seguito illustrata è stata finalizzata alla messa a punto di metodiche quanto più sensibili e specifiche, da adoperare come procedure standard per l'individuazione e la quantificazione di sostanze stupefacenti e dei loro metaboliti nelle matrici

biologiche; alla validazione delle metodiche stesse ed alla loro applicazione a casi reali.

Il lavoro si è avvalso di tecniche analitiche ifenate di Gas Cromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa.

Nel corso del primo anno si è proceduto alla caratterizzazione degli analiti mediante tecniche di GC/MS, utilizzando uno strumento con analizzatore a singolo quadrupolo.

È stata successivamente affrontata la problematica riguardante l'estrazione simultanea degli analiti dalla matrice urinaria e dalla matrice cheratinica, paragonando diverse tecniche di estrazione alla luce delle percentuali di recupero e della necessità di contenere i tempi dell'analisi.

Durante il secondo anno si è proceduto, quindi, alla costruzione di rette di calibrazione per tutte le sostanze secondo le metodiche messe a punto, valutando la linearità della risposta, il limite di rivelabilità ottenibile ed altri parametri della validazione quali: accuratezza, precisione, recupero e stabilità degli analiti e dei campioni biologici.

I metodi analitici sviluppati sono stati applicati alla quantificazione dei livelli di sostanze di abuso in campioni di urina e capelli di soggetti dediti.

Durante il terzo anno del lavoro di tesi si è prestata particolare attenzione allo sviluppo di protocolli operativi per la verifica di assunzione di sostanze stupefacenti in lavoratori con mansioni a rischio per la salute di terzi, ai sensi del provvedimento n. 99/cu del 30.10.2007¹⁴ e successive modifiche, nonché alla verifica dell'adeguatezza di metodiche analitiche, tese alla determinazione nelle urine delle sostanze prescritte dalla legge, ponendo particolare attenzione sulla possibilità di discriminare tra livelli di concentrazione sopra e sotto i livelli di cut-off prescritti.

Il protocollo di raccolta dei campioni si basa sul rispetto della privacy del lavoratore, non prescindendo in alcun modo dalla necessità di verificare l'impossibilità di adulterazione del campione da parte del lavoratore stesso. In tutte le fasi della procedura, dal momento del campionamento fino alla distruzione dei campioni, inoltre, è necessario rispettare la catena di custodia mediante la raccolta di tutta la documentazione che segue il campione, nonché la registrazione di tutto il

personale autorizzato che compie le operazioni di manipolazione dello stesso.

La parte analitica consiste di due macrofasi: la prima di screening attraverso tecniche immunocromatografiche, per una determinazione qualitativa della presenza di sostanze stupefacenti nell'urina e la seconda di conferma mediante tecniche altamente specifiche e sensibili, effettuata in caso di positività allo screening.

Le tecniche per la conferma si sviluppano attraverso l'estrazione degli stupefacenti dalle matrici biologiche e nella rilevazione mediante gas cromatografia e spettrometria di massa (GC/MS).

Il lavoro di ricerca ha previsto:

- caratterizzazione degli analiti mediante GC/MS
- messa a punto di tecniche estrattive delle droghe da entrambe le matrici biologiche
- studio del recupero di estrazione delle metodiche adottate
- studio dei parametri di specificità, sensibilità, accuratezza e precisione delle metodiche adottate
- costruzione di curve di calibrazione mediante l'analisi di campioni di capelli e di urina di soggetti non assuntori, addizionati con quantità note e costanti di standard interno e con quantità note e variabili di analiti
- sviluppo del protocollo operativo di raccolta, trasporto, conservazione ed analisi dei campioni
- sviluppo della catena di custodia
- analisi di campioni di urina di lavoratori soggetti ai controlli previsti dal suddetto provvedimento.

PARTE SPERIMENTALE

2.1 Materiali

Le soluzioni standard di droghe (cocaina, benzoilecgonina, EME, cocaetilene, morfina, metadone, 6-MAM, codeina, THC-COOH, amfetamina, metamfetamina, MDMA, MDA, MDEA) e le soluzioni di deuterati, utilizzati come standard interni (cocaina-D₃, EME-D₃, benzoilecgonina-D₃, 6-MAM-D₆, THC-COOH-D₃, amfetamina-D₆, MDMA-D₅, MDA-D₅) sono state acquistate dalla CERRILIAN (Round Rock, TX, USA).

Tutti gli analiti sono stati forniti in soluzione metanolica alla concentrazione di 1 mg/ml (soluzioni madre); anche i deuterati sono stati acquistati in soluzione metanolica: cocaina-D₃, benzoilecgonina-D₃, 6-MAM-D₆, THC-COOH-D₃, amfetamina-D₆, MDMA-D₅, MDA-D₅ ad una concentrazione di 1 mg/ml, mentre l'EME-D₃ ad una concentrazione di 100 µg/ml.

I test di screening sono stati effettuati con *Multi-Drug Screen Test Panel* per l'identificazione di: Cocaina e Metaboliti, Oppiacei, Amfetamina, Metamfetamina e Cannabinoidi; il metadone è stato testato con *Drug Screen Test Strip*; entrambi i test di screening sono stati forniti da Concateno (UK).

I derivatizzanti adoperati sono: il BSTFA (N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide) all'1% di TMCS (trimetilclorosilano), acquistato dalla SUPELCO (Bellefonte, PA, USA) e l'anidride trifluoro acetica fornita dalla CARLO ERBA (Italia).

L'analisi GC/MS è stata condotta impiegando un sistema costituito da un gas cromatografo FOCUS GC accoppiato ad uno spettrometro di massa DSQ II, con analizzatore a quadrupolo e dotato di un autocampionatore As 3000 (THERMO Scientific, USA).

Le cartucce adottate per l'estrazione in fase solida (SPE) delle droghe dalle urine sono le Screen-C (55 µm, 70 Å) 200 mg/3 ml della Phenomenex (Torrance, CA, USA).

La microfibra in polidimetilsilossano (100 µm) per la microestrazione in fase solida è stata acquistata dalla SUPELCO.

La separazione cromatografica è stata eseguita mediante colonna capillare DB-5ms Ultra Inert (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) prodotta dalla J&W Scientific (USA) e fornita dalla Agilent Technologies (USA).

I reagenti e i solventi utilizzati nelle analisi sono prodotti dalla CARLO ERBA (Italia).

2.2 Metodi

2.2.1 Campionamento

I soggetti che si sottopongono ad analisi per la determinazione di sostanze stupefacenti con finalità medico-legali devono essere identificati mediante documento di riconoscimento da parte dell'operatore che effettua le analisi e, dopo essere stati debitamente informati del significato e della valenza delle analisi stesse, devono firmare un modulo per il consenso informato.

I prelievi devono essere effettuati da personale qualificato e responsabile, che procederà nel rispetto della privacy, a prelevare il campione, avendo cura di campionare un quantitativo di matrice tale da consentire l'effettuazione delle analisi, l'eventuale ripetizione delle stesse, nonché la conservazione di un'aliquota per la revisione in caso questa fosse richiesta dall'interessato.

Tutta la documentazione relativa al campione, unitamente al campione stesso ed alle successive informazioni riguardanti la manipolazione e conservazione del campione costituiscono la catena di custodia.

2.2.1.1 Matrice cheratinica

I capelli e i peli ascellari o del torace, da utilizzare nelle determinazioni di sostanze stupefacenti, sia per la costruzione di campioni a concentrazione nota che per i campioni reali, vengono sottoposti a lavaggio con metanolo, lasciati asciugare a temperatura ambiente, finemente sminuzzati, pesati ed addizionati dello standard

interno, prima di iniziare le procedure di digestione, estrazione ed analisi, differenti a seconda della droga da rivelare.

I capelli per la determinazione delle sostanze stupefacenti devono essere prelevati dalla zona nucale, dopo che ne è stata determinata la lunghezza. In caso sia necessario effettuare un'analisi segmentale per determinare l'abitudine temporale dell'uso delle sostanze, bisogna legare la ciocca di capelli, in maniera tale da distinguere la zona prossimale alla nuca da quella distale. Tutto il materiale utilizzato per il campionamento deve essere precedentemente decontaminato mediante lavaggio con acetone.

Il campionamento dei capelli del soggetto in esame verrà effettuato secondo la seguente procedura:

- Identificazione del soggetto mediante documento di riconoscimento
- Annotazione data di campionamento, nome, cognome e numero identificativo del campione
- Compilazione del consenso informato che deve essere firmato dall'interessato
- Misurazione della lunghezza dei capelli
- Taglio dei capelli

2.2.1.2 Matrice urinaria

La raccolta della matrice urinaria deve essere effettuata in locali dove non siano presenti possibili fonti di inquinamento del campione quali acqua, saponi o detersivi di alcun tipo. Anche per i campionamenti di matrice urinaria è necessario compilare un modulo con tutte le informazioni riportate nel paragrafo precedente, sostituendo la lunghezza dei capelli con il volume di urina del campione. Il materiale adoperato per effettuare la raccolta deve essere integro e sigillato, fino al momento in cui viene consegnato al soggetto interessato. Successivamente al prelievo, al fine di verificare la non adulterazione del campione, vengono misurati il pH e la temperatura della matrice.

2.2.1.3 Procedura di campionamento per gli accertamenti di assenza di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope nei lavoratori

I lavoratori che devono essere sottoposti a test tossicologici, identificati dal datore di lavoro e dal MC, non devono essere avvisati delle suddette analisi prima di 24 h dall'esecuzione delle stesse.

Al momento del prelievo i lavoratori vengono identificati mediante l'esibizione di un documento di riconoscimento e l'operatore provvede alla compilazione del verbale di prelievo in triplice copia (Figura 6). Prima dell'inizio del prelievo e della successiva analisi il lavoratore sarà debitamente informato sul significato dei test che si stanno per eseguire.

Modalità di prelievo:

Il prelievo del campione di urina deve avvenire sotto controllo del medico competente o di un operatore sanitario qualificato, garantendo il rispetto della dignità della persona ed introducendo misure atte ad evitare la possibilità di manomissione del campione, anche prevedendo che il soggetto non sia lasciato solo durante la raccolta. A tale scopo, nel locale per il prelievo di urine, (che deve garantire, se necessario, anche la possibilità di osservazione diretta) non devono essere presenti fonti o materiali utilizzabili per la diluizione o l'adulterazione del campione (acqua corrente, contenitori di sapone, di disinfettanti, di detergenti per la pulizia del locale, etc.).

Il soggetto che deve sottoporsi al prelievo è tenuto a depositare borse ed ogni indumento non necessario (giacche, soprabiti, etc.) in luoghi diversi da quello della raccolta.

Prima del prelievo, inoltre, il soggetto ha l'obbligo di lavarsi accuratamente le mani ed asciugarle, dopo potrà accedere nel locale e ricevere il materiale per il campionamento.

L'urina deve essere raccolta in apposito contenitore monouso di plastica, che deve essere fornito integro e sigillato.

Per ciascun campione si richiede una quantità di urina tale da poter eseguire, oltre i test di screening e conferma, anche eventuali ripetizioni degli stessi, inoltre sarà necessario prevedere anche un controcampione

per eventuali analisi di revisione, in caso di positività alle due analisi precedenti.

Qualora la quantità di urina prodotta sia insufficiente, il campione incompleto è sigillato ed è riaperto solo alla presenza del soggetto per la successiva integrazione di un nuovo campione; il soggetto a tal fine, può assumere bevande analcoliche gassate o non gassate.

Una volta completata l'operazione di raccolta, il responsabile del prelievo provvede direttamente all'analisi di screening o alla suddivisione del campione in tre aliquote sigillate e denominate "A", "B" e "C" da trasferire al laboratorio che eseguirà i test.

L'esecuzione di tutte le operazioni di suddivisione ed etichettatura del prelievo devono essere effettuate alla presenza dell'interessato; in caso lo screening sia effettuato in situ, se l'esito è negativo il campione viene smaltito, viene redatto il verbale, che il responsabile ed il lavoratore firmeranno e l'accertamento si ritiene concluso. Se, invece, l'esito è positivo il campione viene suddiviso in due aliquote "B" e "C" per le successive analisi.

I contenitori contenenti le aliquote di urina (tre o due a seconda di dove è effettuato lo screening) devono essere dotati di tappo a chiusura ermetica antiviolazione oppure chiusi e sigillati con un sigillo adesivo a nastro non rinnovabile, sul quale il lavoratore e il medico appongono congiuntamente la propria firma, e contrassegnati con lettere A, B e C.

Sui contenitori devono essere indicati:

- a. nome e cognome del lavoratore
- b. nome e cognome del medico competente o di chi effettua il prelievo
- c. data e ora del prelievo

La corretta preservazione del campione da qualsivoglia adulterazione, inquinamento, o dispersione di parte va garantita mediante l'utilizzo di materiale idoneo, a perfetta chiusura, non suscettibile di rotture in caso di urto durante il trasporto, o per shock termico durante il congelamento.

Dopo la chiusura i contenitori devono essere inseriti in apposito contenitore termico per la spedizione, dotato di adeguato elemento refrigerante e devono essere inviate nel più breve tempo possibile e

comunque entro 24 ore dal prelievo, al laboratorio per l'esecuzione del test di screening e/o delle analisi di conferma e per l'eventuale analisi di revisione in condizioni che garantiscano la "catena del freddo" ed impediscano qualsiasi manipolazione del campione.

Il trasporto deve avvenire secondo le norme vigenti con allegata copia del verbale di prelievo. Alla consegna, il laboratorio diventa responsabile della custodia e conservazione del campione.

VERBALE DI PRELIEVO

Generalità del Lavoratore

Nome _____ Cognome _____ Data di nascita _____

Luogo di nascita _____ Residente a _____ Via _____

Documento di riconoscimento _____ N° _____ Rilasciato da _____

il ___/___/___ Mansione svolta _____

Medico Competente/Responsabile prelievo

Nome _____ Cognome _____

Prelievo Luogo _____ il ___/___/___ alle ore _____

Quantità di urina raccolta _____ Controllo _____

Esito delle analisi di screening

Cocaina		Cannabinoidi		Amfetam.		Morfina		MDMA		Metadone		Bupren.	
Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Farmaci assunti negli ultimi 7 giorni _____

Dichiarazioni del Lavoratore _____

Il Lavoratore debitamente e compiutamente **informato/a** su tutti gli esami ematologici e/o urinari richiesti per l'accertamento dell'eventuale presenza di sostanze d'abuso e alcol **accetta** di sottoporsi agli accertamenti analitici richiesti ed **autorizza** il dirigente preposto al trattamento e alla conservazione negli archivi dei propri dati di laboratorio secondo i termini di legge.

Responsabile

Lavoratore

Dichiaro che le etichette identificative sono correttamente compilate e da me confrontate. Tutto il materiale utilizzato per il campionamento era integro, chiuso/sigillato. I prelievi sono stati suddivisi, etichettati e sigillati in mia presenza.

Lavoratore

figura 6: modello del verbale di prelievo

Verbale di Prelievo e Trasmissione del Campione:

Il responsabile, dopo esibizione di un documento di riconoscimento, compila per ciascun lavoratore il verbale di prelievo in triplice copia; detto verbale deve riportare:

1. generalità del lavoratore e del medico competente
2. luogo in cui è stato eseguito il prelievo
3. data e ora del prelievo
4. quantità di urina raccolta
5. eventuali dichiarazioni del lavoratore
6. farmaci assunti negli ultimi 7 giorni

Il verbale deve essere firmato dal medico responsabile del prelievo del campione e controfirmato dal lavoratore il quale, in tal modo, attesta la corretta esecuzione del prelievo, inoltre, una copia del verbale è consegnata al lavoratore, una copia rimane al medico competente e l'altra è trasmessa al laboratorio, di norma inserita nel contenitore termico per il trasporto dei campioni.

2.2.2 Preparazione dei campioni

2.2.2.1 Campioni per le curve di calibrazione

Capelli

Mediante diluizione della soluzione madre (1mg/ml), sono state preparate cinque soluzioni standard a concentrazione nota e decrescente per ogni sostanza da analizzare. E' stata preparata, anche, una soluzione a titolo noto per ciascun analogo deuterato, utilizzato come standard interno. La preparazione dei campioni di capelli da analizzare per la costruzione delle rette di taratura ha previsto, per ciascuno dei cinque punti, l'aggiunta di 50 µl della soluzione di analiti e di standard interno. I campioni di capelli a controllo negativo sono stati preparati aggiungendo solo le soluzioni di standard interno.

Il range di concentrazione delle rette di calibrazione, riportato in tabella 3, è stato scelto tenendo conto, per ogni sostanza, del valore di cut-off.

**Concentrazioni dei punti della curva di calibrazione in matrice cheratinica
(ng/mg)**

	<i>Cocaina</i>	<i>Metaboliti cocaina</i>	<i>Oppiacei e metaboliti</i>	<i>THC</i>	<i>THCCOOH</i>	<i>Amfetamine</i>
A	6	0.8	3.2	0.08	0.0032	3.2
B	4	0.4	1.6	0.04	0.0016	1.6
C	2	0.2	0.8	0.02	0.0008	0.8
D	1	0.1	0.4	0.01	0.0004	0.4
E	0.5	0.05	0.2	0.005	0.0002	0.2

tabella 3: Concentrazioni dei punti della curva di calibrazione di ogni sostanza e dei metaboliti, in matrice cheratinica

Urina

Mediante diluizione della soluzione madre (1mg/ml), sono state preparate cinque soluzioni standard a concentrazione nota e decrescente per ogni classe di sostanze. E' stata preparata, anche, una soluzione a titolo noto per ciascun analogo deuterato, utilizzato come standard interno. La preparazione dei campioni urinari da analizzare per la costruzione delle rette di taratura ha previsto, per ciascuno dei cinque punti, l'aggiunta di volumi fissi della soluzione di analiti e di standard interno. I campioni di urina a controllo negativo sono stati preparati aggiungendo solo le soluzioni di standard interno.

Il range di concentrazione delle rette di calibrazione, riportato in tabella 4, è stato scelto tenendo conto, per ogni sostanza, del proprio valore di cut-off.

Oltre ai cinque punti per la curva di calibrazione, sono stati preparati inoltre, tre campioni (in triplicato) con concentrazioni comprese tra il

punto A ed il punto E, i quali serviranno come Quality Control (QC). Le soluzioni standard utilizzate per i QC sono state preparate indipendentemente da quelle utilizzate per la curva di calibrazione.

Concentrazioni dei punti della curva di calibrazione in urina (ng/ml)

	<i>Cocaina e oppiacei</i>	<i>Cannabinoidi</i>	<i>Amfetamine</i>
A	1'033.333	166.666	4'000
B	516.666	83.333	2'000
C	258.333	41.666	1'000
D	129.166	20.833	500
E	64.583	10.416	250

tabella 4: Concentrazioni a titolo noto in urina per ogni classe di sostanze e metaboliti ottenute per la curva di calibrazione

2.2.2.2 Valutazione della stabilità e del recupero d'estrazione in urina

Sono state preparate per ogni classe di stupefacenti, tre soluzioni standard a concentrazione decrescente (tabella 5). Per ciascuna concentrazione sono stati effettuati tre diversi esperimenti per valutare il recupero d'estrazione e la stabilità short e long term delle sostanze:

1. Analisi al tempo 0 (t_0): a 50 μ l di ogni soluzione standard preparata estemporaneamente, sono stati addizionati volumi fissi delle soluzioni di standard interni, portati a secco sotto N_2 , derivatizzati e analizzati in GC/MS.

2. Stabilità short term (t_6): 50 μ l di ogni soluzione standard è stata lasciata circa 6 ore a temperatura ambiente. Prima delle analisi sono state

aggiunte le soluzioni di standard interni, i campioni sono portati a secco, derivatizzati e analizzati in GC/MS.

3. *Recupero d'estrazione*: 50 µl delle soluzioni standard sono stati addizionati a 3 ml (2 ml per le amfetamine) di urina proveniente da soggetti non assuntori, ottenendo tre concentrazioni urinarie decrescenti (tabella 5), delle quali la più bassa coincide con il valore del cut-off analitico. I campioni sono stati estratti subito, secondo le procedure analitiche di ogni categoria di sostanze (descritte in seguito), addizionati di un volume costante di standard interno, portati a secco sotto N₂, derivatizzati e analizzati in GC/MS.

4. *Stabilità long term*: 50 µl delle soluzioni standard sono stati addizionati a 3 ml (2 ml per le amfetamine) di urina proveniente da soggetti non assuntori, ottenendo tre concentrazioni urinarie decrescenti, delle quali la più bassa coincide con il valore del cut-off analitico. I campioni sono stati tenuti per diverse ore in borsa termica e successivamente congelati. Dopo una settimana i campioni sono stati scongelati, addizionati di un volume costante di standard interno, estratti secondo le procedure analitiche di ogni categoria di sostanze (descritte in seguito), portati a secco sotto N₂, derivatizzati e analizzati in GC/MS.

Tutti i campioni sono stati preparati ed analizzati in triplicato.

	<i>Cocainici e oppiacei</i>		<i>Cannabinoidi</i>		<i>Amfetamine</i>	
	[solvente] ng/µl	[urina] ng/ml	[solvente] ng/µl	[urina] ng/ml	[solvente] ng/µl	[urina] ng/ml
<i>A</i>	54	600	8.1	135	135	2'250
<i>B</i>	18	300	2.7	45	45	750
<i>C</i>	6	100	0.9	15	15	250

tabella 5: Concentrazioni delle soluzioni standard ed in urina preparate per le prove di stabilità e recupero d'estrazione

2.2.3 Analisi della matrice cheratinica

2.2.3.1 Procedura per l'analisi delle amfetamine

Pretrattamento dei campioni ed estrazione (SPE)

A 200 mg di capelli sono addizionati 4 ml di tampone fosfato 0.1 M pH 6; successivamente i campioni sono centrifugati a 3500 rpm.

Per l'estrazione le cartucce Screen-C sono condizionate con 2 ml di metanolo, seguiti da 2 ml di tampone fosfato. Il campione è quindi caricato in colonna ed estratto a flusso costante (circa 1 ml/min). Successivamente le cartucce sono lavate con 1 ml di acido acetico 1 M e fatte asciugare per 15 min. sotto vuoto; in seguito le cartucce sono lavate ulteriormente con 6 ml di metanolo e fatte asciugare per 15 min. sotto vuoto. La fase di eluizione degli analiti è eseguita con un'aliquota da 2 ml di una miscela (estemporanea) di isopropanolo-diclorometano-ammoniaca (78:20:2, v:v:v). L'eluato è stato portato a secco sotto N₂.

Derivatizzazione

Per la derivatizzazione delle amfetamine si aggiungono 100 µl di HFBA (dopo aver verificato l'assenza di qualsiasi traccia di solvente) e si pongono i campioni in un bagno termostato a 70°C per 20 min.; i campioni sono portati a secco sotto flusso di N₂ e ripresi con 50 µl di etil acetato. Si procede, in seguito, con l'analisi GC/MS.

In modo analogo sono stati trattati i campioni incogniti, ai quali, inizialmente, sono stati aggiunti solo gli standard interni.

2.2.3.2 Procedura per l'analisi di cocaina e oppiacei

Idrolisi acida

200 mg di capelli sono pretrattati aggiungendo 2 ml di HCl 0.1 N e incubando per 18 h a 45°C. Dopo aver lasciato raffreddare i campioni, sono stati addizionati di 2 ml di tampone fosfato 0.1 N, 4 gocce di NaOH 2 N e centrifugati a 2000 rpm per 5 min.

Procedura d'estrazione

Le cartucce Screen-C, utilizzate per l'estrazione, sono condizionate con 2 ml di metanolo, seguiti da 2 ml di tampone fosfato 0.1 M pH 6. Il campione è quindi caricato in cartuccia ed estratto. Successivamente le cartucce sono sottoposte a lavaggio con 6 ml di acqua bidistillata, seguiti da 3 ml di HCl 0.1 N, 9 ml di metanolo e lasciate quindi ad asciugare per 15 min. sotto vuoto. La fase di eluizione degli analiti è eseguita con due aliquote da 2 ml di una miscela (estemporanea) di diclorometano-metanolo (8:2, v:v), al 2% di ammoniaca. L'eluato è poi portato a secco sotto N₂.

Derivatizzazione

Per la derivatizzazione di cocaina e oppiacei si aggiungono 50 µl di BSTFA (dopo aver verificato l'assenza di qualsiasi traccia di solvente) e si pongono i campioni in un bagno termostato a 75°C per 20 min. Si procede con l'analisi GC/MS.

In modo analogo sono trattati i campioni incogniti, ai quali, inizialmente, sono aggiunti solo i deuterati (standard interni).

2.2.3.3 Procedura per l'analisi dei cannabinoidi

Idrolisi basica e estrazione liquido/liquido

Per tutti i campioni, costituiti da 200 mg di capelli, è stata eseguita un'idrolisi basica mediante aggiunta di 2 ml di NaOH 2 M e incubando per 30 min. a 45°C.

I campioni sono stati lasciati raffreddare ed in seguito addizionati di 5 ml di una miscela di esano-etil acetato 9:1 (v:v) (al fine di estrarre il THC) e centrifugati a 2000 rpm per 10 min. Il procedimento viene ripetuto 2 volte.

La fase organica è successivamente recuperata, mentre la fase acquosa è portata a pH 4 mediante aggiunta di 400 µl di acido acetico glaciale. Quest'ultimo passaggio è necessario al fine di ottenere il THCCOOH in forma di acido libero a partire dalla sua forma anionica, formatasi durante l'idrolisi basica.

Alla fase acquosa, quindi, sono addizionati nuovamente 5 ml (per 2 volte) di una miscela di esano-etil acetato 9:1 (v:v) e i campioni sono

centrifugati a 2000 rpm per 10 min. La fase organica è prelevata, unita alla fase organica recuperata precedentemente e portata a secco sotto N₂.

Derivatizzazione

Per la derivatizzazione del THC e del THCCOOH si aggiungono 50 µl di BSTFA (dopo aver verificato l'assenza di qualsiasi traccia di solvente) e si pongono i campioni in un bagno termostato a 75°C per 20 min. Si procede con l'analisi in GC/MS.

In modo analogo sono stati trattati i campioni incogniti, ai quali, inizialmente, è stato aggiunto solo lo standard interno.

2.2.4 Analisi della matrice urinaria

2.2.4.1 Procedura per le analisi di screening

Le analisi di screening si eseguono mediante test monofase per la determinazione simultanea qualitativa di droghe e loro metaboliti nell'urina, costituiti da pannello di strisce reattive montate su un supporto in plastica. Per l'esecuzione dei test è necessario immergere il pannello di strisce verticalmente, in direzione delle frecce, nel campione di urina per almeno 10-15 secondi, avendo cura di non superare la linea del livello massimo (MAX) indicata sul pannello, durante l'immersione (figura 7).

Successivamente appoggiare il pannello di strisce reattive su una superficie piana non assorbente, far partire il timer e attendere che compaiano le bande rosse dopo completa migrazione dell'urina per capillarità. Il risultato deve essere letto dopo 5 minuti.

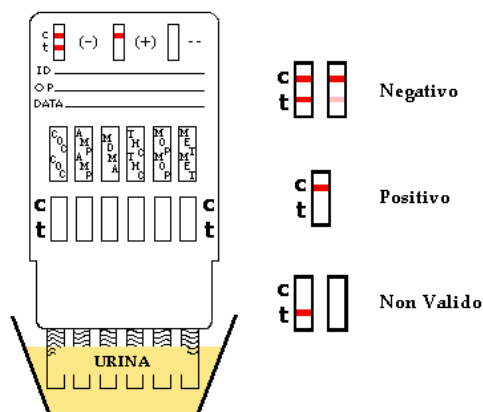


figura 7: esempio di pannello di strisce utilizzato nei test di screening

2.2.4.2 Procedura per l'analisi di conferma delle amfetamine

Pretrattamento dei campioni ed estrazione (SPME)

A 2 ml di urina si aggiungono 1 g di NaCl e 100 µl di NaOH 2 M. Le vial contenenti il campione si chiudono ermeticamente e si pongono in bagno termostato a 95°C per circa 15 min. Dopo l'inserimento della fibra, i campioni si lasciano ancora per 15 min. a 95°C, in modo da garantire l'adsorbimento delle amfetamine presenti nello spazio di testa sul rivestimento della fibra.

Derivatizzazione

Dopo la fase di adsorbimento, si inserisce la siringa con la fibra in un'altra vial (10 ml) contenente 100 µl di anidride trifluoro acetica e si lascia a 60°C per 20 min. Successivamente si procede all'analisi in GC/MS.

In modo analogo sono trattati i campioni reali, ai quali è aggiunto solo lo IS a concentrazione nota.

2.2.4.3 Procedura per l'analisi di cocaina e oppiacei

Idrolisi acida

I campioni sono pretrattati aggiungendo 1 ml di HCl al 37% e incubando per 20 min. a 120° C (in pentola a pressione). Dopo aver lasciato raffreddare i campioni, si addizionano 600 µl di Tris Buffer 2.0 M (pH 8.1) e 400 µl di KOH 10 M saturato con KHCO₃, assicurandosi che il pH sia compreso tra 8.0 e 9.0 e aggiustandolo eventualmente con piccole aliquote di HCl 1.0 M o KOH 10 M saturato con KHCO₃.

È da sottolineare che l'idrolisi acida è effettuata allo scopo di idrolizzare la morfina glucuronata, per cui se l'analisi è mirata alla sola conferma di cocaina e metaboliti, il pretrattamento sopra descritto non deve essere effettuato, ma il campione può essere sottoposto direttamente alla successiva fase di estrazione.

Procedura d'estrazione (SPE)

Le cartucce Screen-C, utilizzate per l'estrazione, sono condizionate con 2 ml di metanolo, seguiti da 2 ml di tampone fosfato 0.1 M pH 6. Il campione è quindi caricato in colonna ed estratto a flusso costante (circa 1 ml/min). Successivamente le cartucce sono sottoposte a lavaggio con 6 ml di acqua bidistillata, seguiti da 3 ml di HCl 0.1 N, 9 ml di metanolo e lasciate quindi ad asciugare per 15 min. sotto vuoto. La fase di eluizione degli analiti è eseguita con due aliquote da 2 ml di una miscela (estemporanea) di diclorometano-metanolo (8:2, v:v), al 2% di ammoniaca. L'eluato è poi portato a secco sotto N₂.

Derivatizzazione

Per la derivatizzazione di cocaina e oppiacei si aggiungono 50 µl di BSTFA (dopo aver verificato l'assenza di qualsiasi traccia di solvente) e si pongono i campioni in un bagno termostato a 75°C per 20 min. Si procede quindi all'analisi in GC/MS.

In modo analogo sono trattati i campioni incogniti, ai quali, inizialmente, sono aggiunti solo i deuterati (standard interni).

2.2.4.4 Procedura per l'analisi dei cannabinoidi

Idrolisi basica

Per tutti i campioni è stata eseguita un'idrolisi basica mediante aggiunta di 300 µl di KOH 10 M e incubando per 15 min. a 60°C.

Dopo aver lasciato raffreddare i campioni, sono stati addizionati 400 µl acido acetico glaciale e 3 ml di una soluzione di acido fosforico 50 mM.

Procedura d'estrazione (SPE)

Le cartucce Screen-C sono condizionate con 1 ml di metanolo, seguiti da 1 ml di sodio acetato 0.1 M al 5% di metanolo.

Il campione è quindi caricato in colonna ed estratto a flusso costante (circa 1 ml/min). Successivamente le cartucce sono sottoposte a lavaggio con 2 ml di una soluzione di acqua bidistillata e metanolo (40:60, v:v) e lasciate quindi ad asciugare per 15 min. sotto vuoto. La fase di eluizione degli analiti è eseguita con due aliquote da 2 ml di una miscela di esano-etilacetato (75:25, v:v) all'1% di acido acetico glaciale. L'eluato è poi portato a secco sotto N₂.

Derivatizzazione

Per la derivatizzazione del THCCOOH si aggiungono 50 µl di BSTFA (dopo aver verificato l'assenza di qualsiasi traccia di solvente) e si pongono i campioni in un bagnetto con termostato a 75°C per 20 min. Si procede con l'analisi in GC/MS.

In modo analogo sono stati trattati i campioni incogniti, ai quali, inizialmente, è stato aggiunto solo lo standard interno.

2.2.5 Condizioni strumentali

Colonna cromatografica	DB-5ms Ultra Inert (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)
Carrier gas	He
Flusso carrier gas	1.0 ml/min
Temperatura dell'iniettore (split/splitless)	245°C (per cocaina, oppiacei e cannabinoidi) 265°C (per amfetamine)
Tecnica di iniezione	Splitless
Volume di iniezione	1 µl
Temperatura transfer line	260°C
Energia degli elettroni	70 eV
Corrente di emissione	50 µl
Temperatura sorgente di ionizzazione	240°C

Le programmate di temperatura sono diverse per ogni classe di sostanze:

Cocaina e oppiacei:

60°C	a 20°C/min
100°C per 1 min.	a 10°C/min
280°C per 5 min.	

Amfetamine

100°C a 10°C/min
210°C a 20°C/min
290°C per 1 min.

Cannabinoidi

150°C a 10°C/min
300°C per 1 min.

2.2.5.1 Parametri di acquisizione

La caratterizzazione completa degli analiti ha permesso di ricavare le seguenti informazioni:

- tempi di ritenzione relativi all'analisi GC;
- condizioni di eluizione, rappresentate dalle temperature di iniezione e dal gradiente di temperatura per l'analisi GC;
- spettro di massa full scan di ogni sostanza;
- scelta di frammenti caratteristici per ogni sostanza: acquisizione SIM.

I parametri di acquisizione variano a seconda dell'analita e del derivatizzante adoperato. Di seguito sono riportati i tempi di ritenzione e gli ioni acquisiti in modalità SIM per ogni sostanza (tabella 7).

Analiti	T_r (min.)	Ioni selezionati (m/z)
<i>Cocaina</i>	18.08	82.20, 182.30, 303.20
<i>Benzoilecgonina</i>	18.61	82.20, 240.20, 361.20
<i>EME</i>	11.24	82.20, 96.20, 240.30
<i>Cocaetilene</i>	18.59	82.20, 196.20, 272.20
<i>Cocaina-D₃</i>	18.06	85.20, 185.20, 306.20
<i>EME-D₃</i>	11.22	85.20, 99.20, 243.30
<i>Benzoilecgonina-D₃</i>	18.60	85.20, 243.20, 364.20
<i>Morfina</i>	20.52	401.00, 414.00, 426.00
<i>6-MAM</i>	21.06	287.20, 340.20, 399.20
<i>6-MAM-D6</i>	20.99	290.20, 343.20, 405.20

<i>Codeina</i>	20.13	313.14, 343.19, 371.20
<i>Metadone</i>	17.40	165.10, 223.10, 294.20
<i>THC-COOH</i>	14.26	473.30, 488.30, 489.30
<i>THC-COOH-D₃</i>	14.24	476.30, 491.30, 492.30
<i>Amfetamina</i>	5.13	91.10, 118.13, 140.01
<i>MDA</i>	8.99	135.01, 162.09, 275.12
<i>MDMA</i>	10.37	154.08, 162.14, 289.17
<i>Amfetamina-D₆</i>	5.10	93.12, 123.15, 144.03
<i>MDA-D₅</i>	8.96	136.03, 166.13, 280.14
<i>MDMA-D₅</i>	10.33	158.03, 164.13, 294.16

tabella 7: tempi di ritenzione e ioni caratteristici degli analiti

2.2.6 Campioni reali

Durante il periodo di tesi sono state effettuate analisi con diversa finalità medico-legale. In particolare sono state eseguite 33 indagini su matrice cheratinica, 145 test di screening immunochimico e 63 analisi GC/MS per la ricerca di sostanze stupefacenti su urina.

I campioni di capelli e/o peli sono stati raccolti da personale qualificato dopo aver ottenuto o un consenso informato da parte dell'interessato o un'autorizzazione da parte di un magistrato, nel caso in cui il campione veniva effettuato in carcere. Ad ogni campione è stato assegnato un numero, riportato anche sul modulo di campionamento ed il campione è stato conservato a temperatura ambiente fino all'inizio della procedura di analisi mentre i documenti sono stati conservati in un armadio chiuso a chiave.

Per le analisi di screening su campioni urinari, laddove la minzione non è avvenuta in presenza del medico competente (MC) o di un operatore sanitario autorizzato, si è proceduto al controllo di parametri chimico-fisici, quali temperatura, pH, livello di creatinina, concentrazione di nitriti, assenza di ossidanti o glutaraldeide, mediante l'utilizzo di specifici kit antiadulterazione. In caso di esito positivo del suddetto test, i

campioni sono stati suddivisi in aliquote chiusi e sigillati secondo il protocollo per le indagini sui lavoratori con mansioni a rischio.

Le analisi GC/MS di campioni urinari sono state eseguite sia su campioni risultati positivi alle analisi di screening, sia su campioni provenienti da altri laboratori o su richiesta di privati.

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Sensibilità e specificità

La specificità del metodo è garantita, invece, dall'assenza di composti interferenti, caratterizzati da ioni con rapporto m/z uguali a quelle degli analiti ed eluenti allo stesso tempo di ritenzione. Per valutare la specificità sono stati preparati, estratti ed analizzati campioni in matrice, provenienti da soggetti non assuntori, addizionati unicamente dello standard interno; l'analisi è stata condotta per ogni analita e per entrambe le matrici. I cromatogrammi così acquisiti hanno rivelato, in taluni casi, la presenza di segnali interferenti, al tempo di ritenzione degli analiti, in entrambe le matrici. Si è cercato di eliminare tali interferenze estraendo dalla corrente ionica acquisita nel metodo un unico frammento. In figura 8 è riportato come esempio il cromatogramma di un campione bianco di urina processato con la metodica relativa al THCCOOH, come è possibile vedere dalla figura nel pannello (a) è presente un picco cromatografico al tempo di ritenzione dell'analita (14.28 min.) e tale picco scompare nel pannello (b) relativo alla medesima analisi, in cui si è estratto solo lo ione con m/z 473.3.

L'eliminazione degli interferenti mediante estrazione di un frammento ha permesso l'eliminazione di tutti i segnali interferenti, garantendo in tal modo, la specificità delle analisi per ciascun analita. I cromatogrammi sono riportati di seguito, nelle figure (9, 10, 11,12) è riportato, per ciascuna classe di sostanze un cromatogramma relativo ad un'analisi SIM di campioni di matrice addizionati con le sostanze stupefacenti (pannello a) ed un cromatogramma relativo all'analisi di matrice alla quale sono stati aggiunti solo gli standard interni (pannello b).

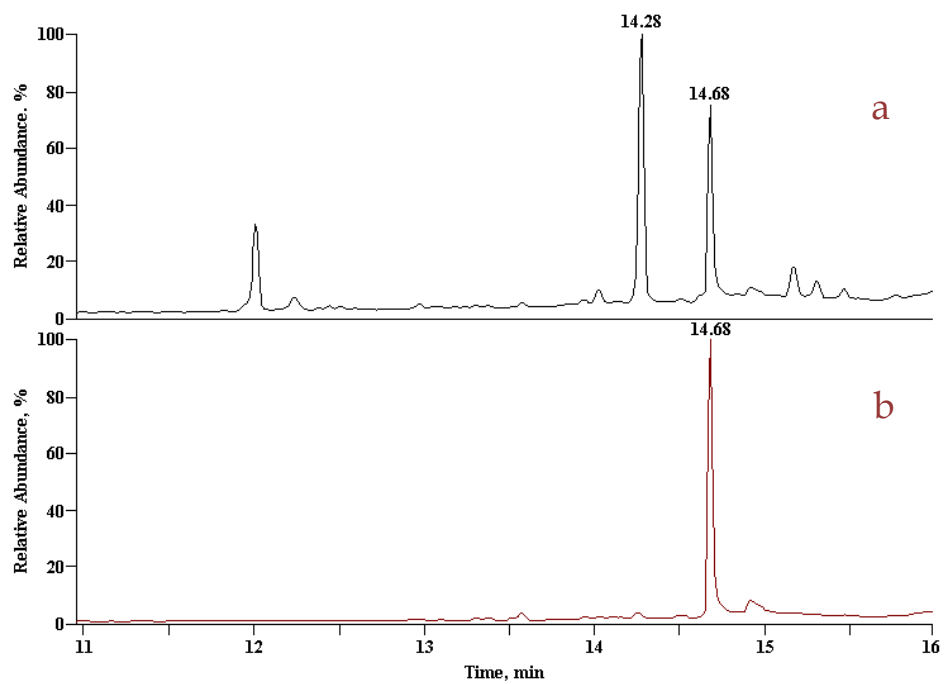


figura 8: cromatogramma relativo all'analisi per la determinazione del THCCOOH di un campione bianco acquisito in SIM a) total ion current; b) estratto del frammento con m/z 473.3

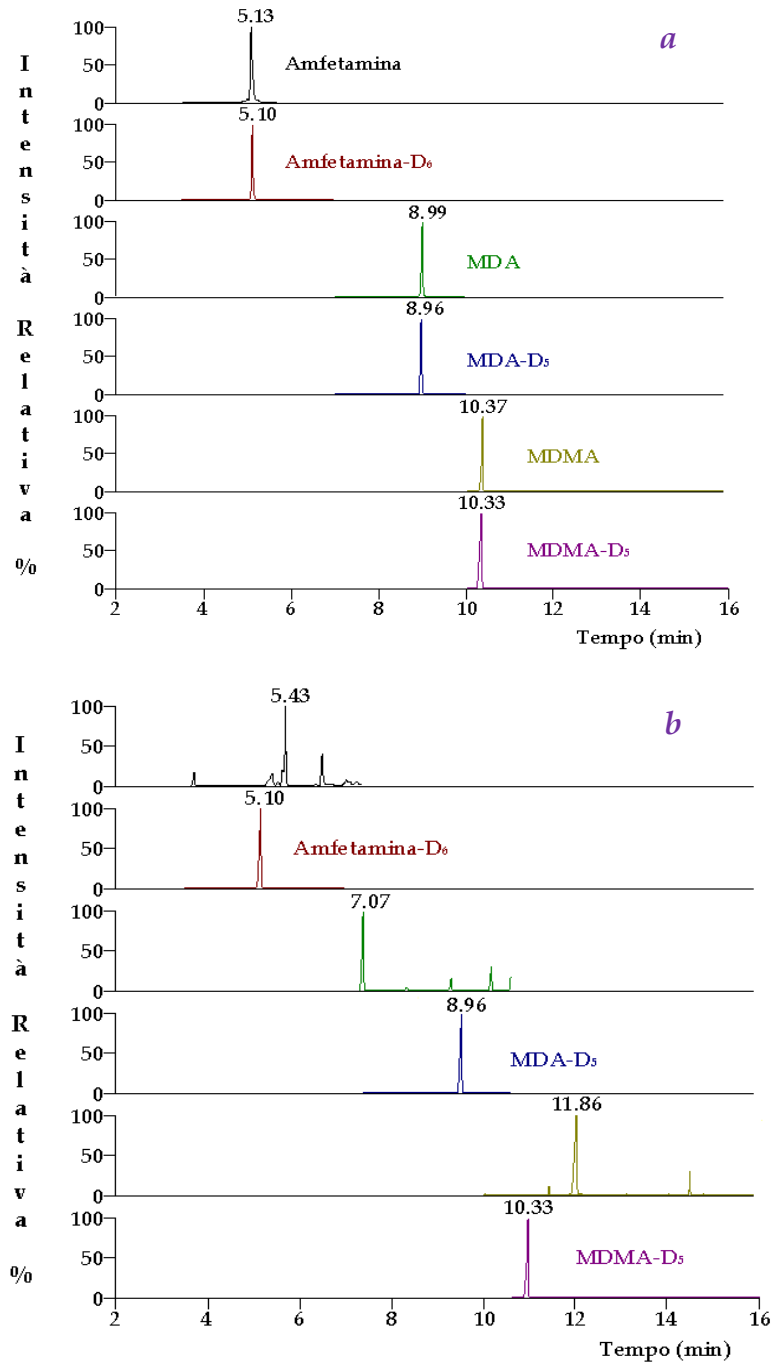


figura 9: a) cromatogramma amfetamina e amfetaminosimili;
 b) cromatogramma bianco di matrice con IS

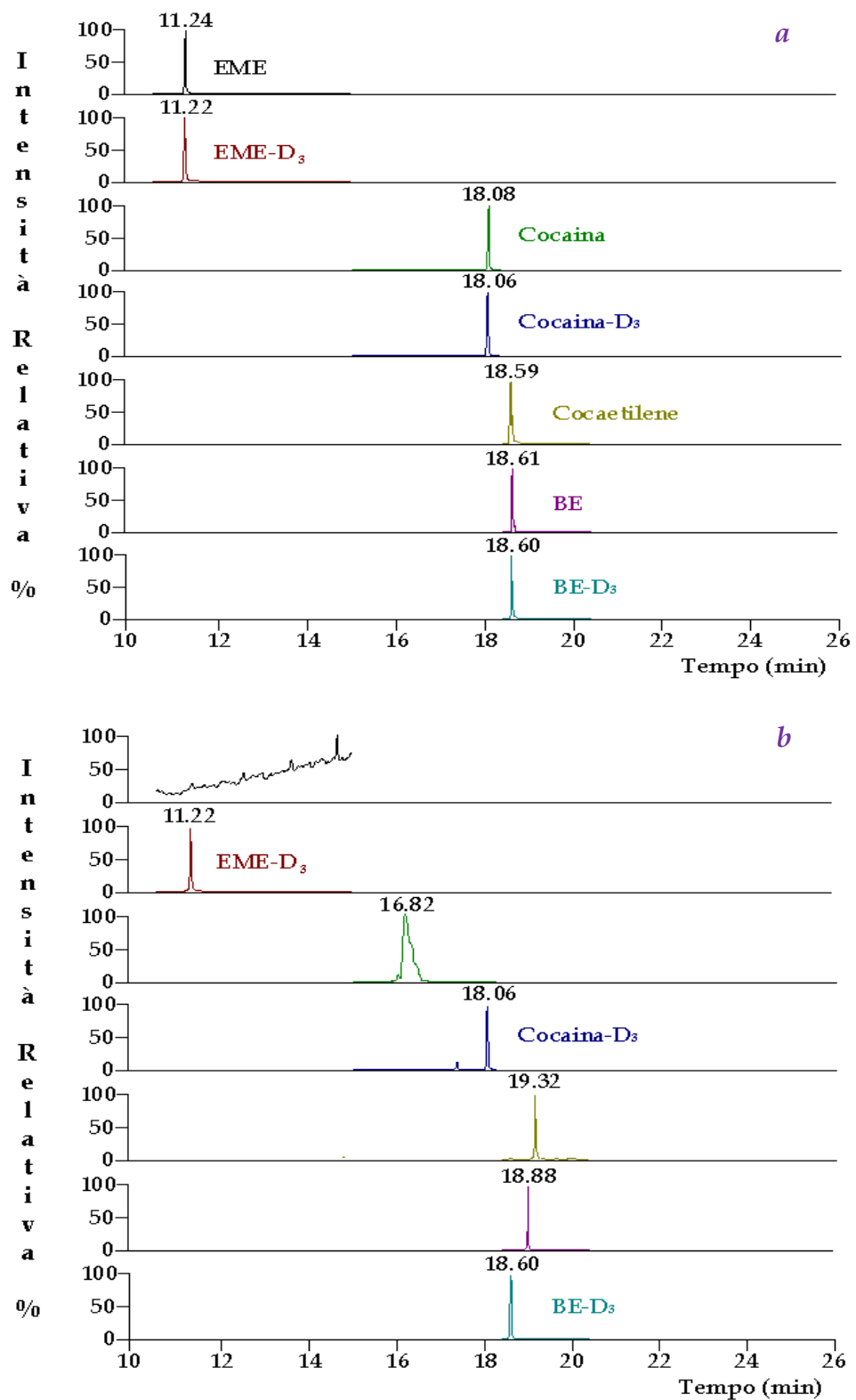


figura 10: a) cromatogramma cocainici; b) cromatogramma bianco di matrice con IS

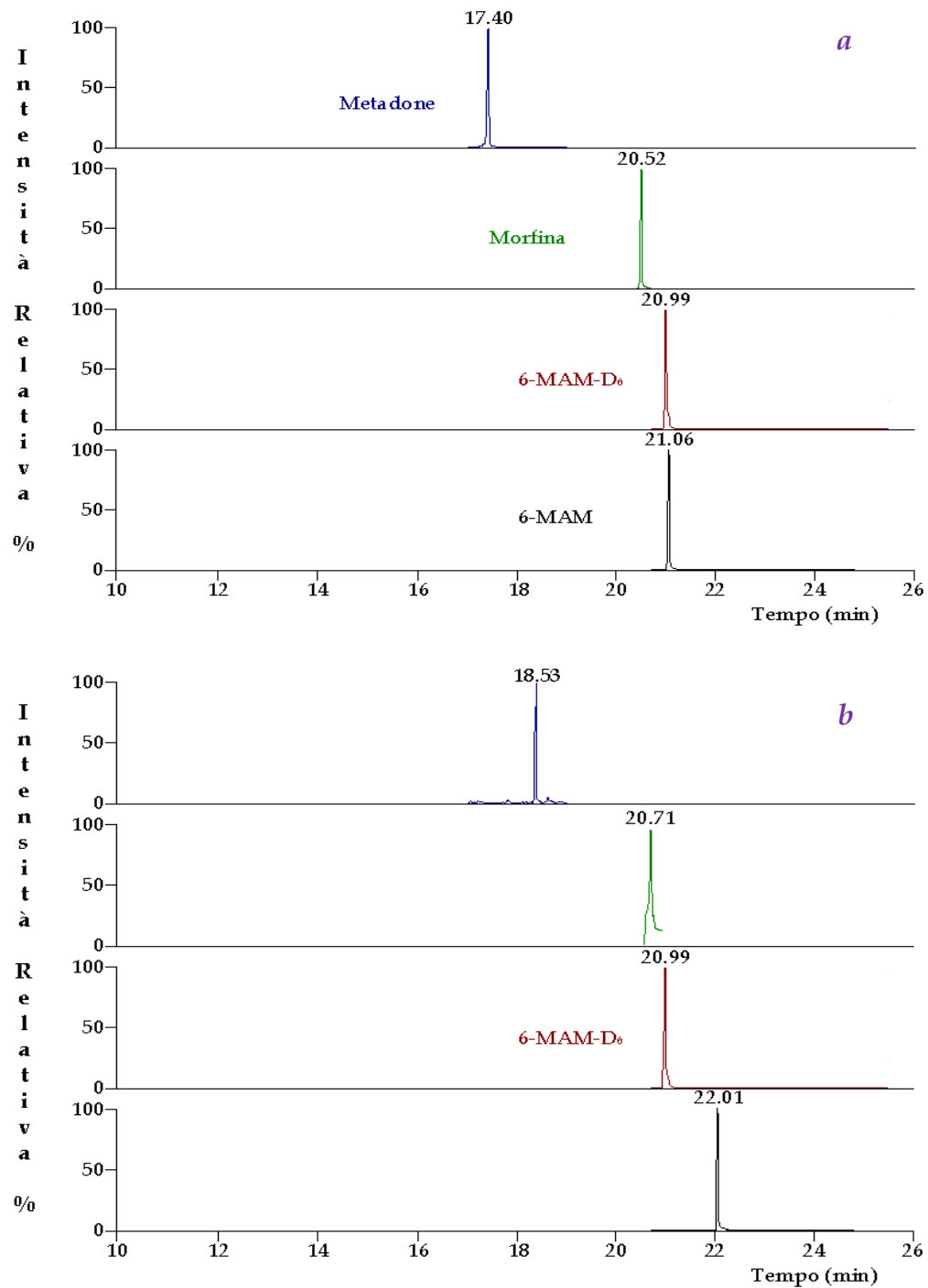


figura 11: a) Cromatogramma oppiacei; b) Cromatogramma bianco di matrice con IS

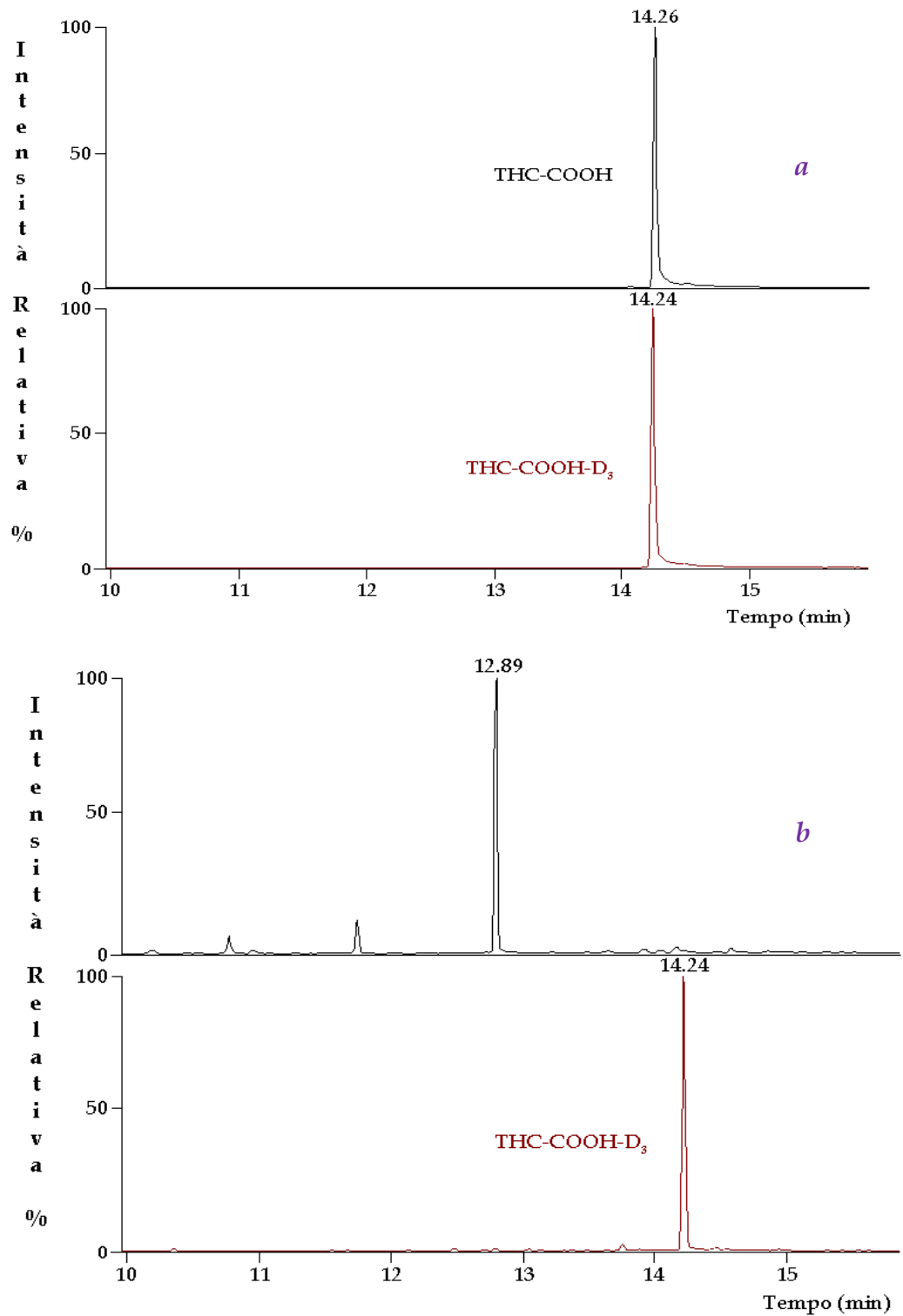


figura 12: a) Cromatogramma cannabinoidi; b) Cromatogramma bianco di matrice con IS

Uno dei modi per la determinazione della sensibilità di una metodica è analizzare soluzioni standard dell'analita, a concentrazioni decrescenti e valutare la concentrazione più bassa capace di originare un picco cromatografico riconoscibile con certezza mediante il suo spettro di massa, per il quale il rapporto segnale/rumore non sia inferiore a 3/1.

Nel caso di analisi finalizzate alla determinazione tossicologica-forense delle droghe, le metodiche adoperate devono avere un livello di sensibilità uguale o inferiore al cut-off.

Per questo tipo di analisi quindi sono stati analizzati campioni in matrice contenenti gli analiti ad una concentrazione pari al proprio cut-off e per questi campioni è stato misurato il rapporto segnale/rumore, verificando che fosse uguale o maggiore di 3/1.

I primi esperimenti condotti su matrice cheratinica sono stati effettuati su una quantità di capelli pari a 50 mg, dati i valori di cut-off molto bassi per questa matrice, utilizzando 50 mg non si è ottenuta una sensibilità soddisfacente, gli esperimenti quindi, sono stati ripetuti utilizzando una quantità di capelli pari a 200 mg, ottenendo per tutti gli analiti dei valori di rapporto segnale/rumore uguali o maggiori di 3.

I rapporti segnale rumore per ciascun analita in entrambe le matrici sono riportati in tabella 8.

Analita	Segnale/Rumore Capelli	Segnale/Rumore Urina
<i>Cocaina</i>	14.2	441
<i>Benzoilecgonina</i>	4	162
<i>EME</i>	3.2	278
<i>Cocaetilene</i>	13	1507
<i>Morfina</i>	3.1	1152
<i>6-MAM</i>	3.7	179
<i>Codeina</i>		355
<i>Metadone</i>		83
<i>THC</i>	10	--
<i>THCCOOH</i>	3.8	1373
<i>Amfetamina</i>	9	364

<i>Metamfetamina</i>	8.2	774
<i>MDA</i>	10.8	223
<i>MDMA</i>	12	142
<i>MDEA</i>		481

tabella 8: rapporti segnale/rumore degli analiti alla concentrazione di cut-off

I valori di segnale/rumore più alti nel caso della matrice urinaria, sono dovuti alla differente concentrazione di cut-off per le due matrici.

3.2 Rette di calibrazione

La *linearità* della risposta è stata valutata calcolando per ogni analita e per ogni matrice, l'equazione della curva di calibrazione e il relativo coefficiente di correlazione (R^2): quanto più il valore di R^2 è prossimo all'unità, tanto più si verifica una correlazione di tipo lineare tra la risposta strumentale e la concentrazione dell'analita.

Per ciascun analita è stata costruita una retta di taratura in matrice cheratinica come descritto precedentemente e dai cromatogrammi ottenuti è stato possibile ricavare il rapporto tra l'area del picco di ogni analita e quella dello standard interno per ogni punto della retta di calibrazione ed è stato riportato su un grafico in funzione della concentrazione.

Le equazioni delle rette di taratura ($y = ax + b$), così ottenute ed i corrispettivi coefficienti di correlazione, sono riportati in tabella 9 e 10.

Analita	Equazione della retta di taratura	R^2
<i>Cocaina</i>	$y = 0.4833 x - 0.0592$	0.9999
<i>Benzoilecgonina</i>	---	---
<i>EME</i>	---	---
<i>Morfina</i>	$y = 0.2163 x - 0.0081$	0.9915

<i>6-MAM</i>	$y = 0.2343 x - 0.0167$	0.9986
<i>Codeina</i>	$y = 0.3845 x + 0.0248$	0.9899
<i>Metadone</i>	$y = 0.2247 x + 0.0346$	0.9937
<i>THC</i>	$y = 0.3543 x - 0.1258$	0.9995
<i>THCCOOH</i>	---	---
<i>Amfetamina</i>	$y = 0.3252 x - 0.1054$	0.9884
<i>Metamfetamina</i>	$y = 0.2465 x - 0.1374$	0.9899
<i>MDA</i>	$y = 0.2654 x - 0.0895$	0.9976
<i>MDMA</i>	$y = 0.5634 x - 0.1401$	0.9912
<i>MDEA</i>	$y = 0.1893 x - 0.1132$	0.9991

tabella 9: Equazioni della curva di calibrazione in matrice cheratinica di ogni analita e rispettivi coefficienti di correlazione

Come si evince dai valori di R^2 , i criteri di linearità sono rispettati per molti degli analiti presi in esame. Per i metaboliti di cocaina e THC, tuttavia, non sono state ottenute curve di calibrazione lineari a causa del range di concentrazione basso dovuto ai valori di cut-off che sono, rispettivamente, 0.05 e 0.0002 ng/mg. Per queste sostanze non è possibile ottenere una quantificazione accurata. Tuttavia al fine di verificare l'assunzione di sostanze stupefacenti è sufficiente che le metodiche applicate siano sensibili al valore di cut-off dei metaboliti per poterne verificare con certezza la presenza, mentre la quantificazione sarà effettuata unicamente sulla sostanza d'abuso, in questo caso cocaina e THC. La rivelazione dei metaboliti, congiuntamente alla quantificazione della droga, permette di discriminare tra l'uso della sostanza o una qualsiasi contaminazione esterna.

Analogamente a quanto illustrato per la matrice cheratinica per ciascun analita è stata costruita una retta di taratura in matrice urinaria.

Le equazioni delle rette di taratura ed i corrispettivi coefficienti di correlazione, sono riportati in tabella 10.

Analiti	Equazione della retta di taratura	R²
<i>Cocaina</i>	$y = 0.0090 + 0.0009 x$	0.9994
<i>Benzoilecgonina</i>	$y = 0.0126 + 0.0003 x$	0.9997
<i>Cocaetilene</i>	$y = -0.2162 + 0.0059 x$	0.9978
<i>EME</i>	$y = -0.0008 + 0.0032 x$	0.9999
<i>Morfina</i>	$y = 0.1834 + 0.0057 x$	0.9961
<i>6-MAM</i>	-	-
<i>Codeina</i>	$y = -4.5491 + 0.0746 x$	0.9993
<i>Metadone</i>	$y = -0.7028 + 0.0048 x$	0.9933
<i>THCCOOH</i>	$y = 0.0062 + 0.0059 x$	0.9991
<i>Amfetamina</i>	$y = -0.1170 + 0.0147 x$	0.9966
<i>Metamfetamina</i>	$y = 0.0172 + 0.0068 x$	0.9989
<i>MDA</i>	$y = 0.1164 + 0.0147 x$	0.9966
<i>MDMA</i>	$y = 0.0235 + 0.0049 x$	0.9990

tabella 10: Equazioni della curva di calibrazione in urina di ogni analita e rispettivi coefficienti di correlazione

Come si evince dai valori di R², i criteri di linearità sono rispettati per tutti gli analiti presi in esame; solo per la 6-MAM non è stato possibile effettuare una curva di calibrazione. E' stato verificato, infatti, che durante l'idrolisi acida, prevista dalla metodica analitica, essa perde il gruppo acetilico in posizione 6 evolvendo in morfina.

Le rette di calibrazione sono state utilizzate per la quantificazione dei campioni reali e la concentrazione dell'analita è stata calcolata in base all'equazione:

$$x = (y - b) / a$$

y = valore del rapporto tra le aree dei picchi cromatografici dell'analita rispetto allo standard interno.

3.3 Accuratezza e precisione

Accuratezza e precisione sono state calcolate rispettivamente come la deviazione percentuale dalle concentrazioni nominali (Acc%) ed il coefficiente di variazione percentuale (CV%).

Per assicurare riproducibilità dell'intero metodo di analisi, accuratezza e precisione sono state calcolate mediante l'analisi di nove QC, preparati indipendentemente dai punti della retta e contenenti tre livelli di concentrazione in matrice compresi tra il Punto A ed il Punto E delle rispettive curve di taratura in entrambe le matrici. I valori ottenuti sono mostrati in tabella 11 e 12.

Come è possibile notare dai valori riportati in tabella, sia l'accuratezza che la precisione rientrano nel 15% per le concentrazioni alta e media e nel 20% per la concentrazione uguale al cut-off, per cui le metodiche adottate sono adatte alla quantificazione di campioni reali.

	QC 1 (6 ng/mg)		QC 2 (1.5 ng/mg)		QC 3 (0.75 ng/mg)	
	Acc%	CV%	Acc%	CV%	Acc%	CV%
<i>Cocaina</i>	-3.39±0.91	16.92	1.33±0.05	3.42	6.66±0.05	11.45
	QC 1 (3.0 ng/mg)		QC 2 (1.5 ng/mg)		QC 3 (0.375 ng/mg)	
<i>Morfina</i>	9.44±0.26	7.88	13.34±0.33	19.23	2.22±0.09	20.16
<i>6-MAM</i>	2.00±0.10	6.79	11.67±0.23	6.98	10.22±0.04	11.24

<i>Amfetamina</i>	-0.22± 0.38	4.64	5.56±0.37	11.63	2.22±0.25	16.31
<i>Metamfetamina</i>	3.56±0.11	13.77	7.56±0.02	5.16	6.43±1.40	11.78
<i>MDMA</i>	0.80±30.7	5.08	-3.82±13.4	9.25	6.30±54.2	16.99
<i>MDA</i>	4.22±1.70	13.30	-8.48±0.48	9.19	2.76±5.9	7.72

	QC 1 (0.3 ng/mg)		QC 2 (0.07 ng/mg)		QC 3 (0.015 ng/mg)	
<i>THC</i>	3.44±0.43	13.80	-11.7±0.208	15.51	13.33±0.21	20.90

tabella 11: Deviazioni percentuale dalle concentrazioni nominali (Acc%) e coefficienti di variazione percentuale (CV%) in matrice cheratinica

	QC 1 (900 ng/ml)		QC 2 (300 ng/ml)		QC 3 (100 ng/ml)	
	Acc%	CV%	Acc%	CV%	Acc%	CV%
<i>Cocaina</i>	0.42±0.91	0.92	-7.57±0.36	0.34	16.40±0.40	0.48
<i>EME</i>	-0.77±1.75	1.74	-13.9±3.40	2.98	7.82±5.21	5.65
<i>Benzoilecgonina</i>	0.80±0.32	0.33	-2.80±0.49	0.48	7.98±0.38	0.41
<i>Cocaetilene</i>	2.89±1.09	1.13	0.44±1.19	1.20	-1.01±1.16	1.15
<i>Morfina</i>	-3.49±3.82	3.69	-10.98±1.36	1.22	-2.62±2.25	2.19
<i>6-MAM</i>	--	--	--	--	--	--
<i>Metadone</i>	8.02±5.74	3.58	11.13±3.26	5.38	10.88±6.35	2.72

	QC 1 (135 ng/ml)		QC 2 (45 ng/ml)		QC 3 (15 ng/ml)	
<i>THC-COOH</i>	-0.53±2.82	2.81	-2.96±4.67	4.54	-9.40±3.85	3.52

	QC 1 (2250 ng/ml)		QC 2 (750 ng/ml)		QC 3 (250 ng/ml)	
<i>Amfetamina</i>	-2.02±0.97	6.78	8.34±1.53	1.59	6.48±1.06	2.77
<i>Metamfetamina</i>	8.0±3.6	3.4	4.2±12.0	11.5	8.5±4.9	4.5
<i>MDMA</i>	5.2±12.5	11.9	-7.2±14.2	15.3	2.4±1.8	1.8
<i>MDA</i>	1.8±15.0	14.8	2.3±8.4	8.2	1.9±7.6	7.4

tabella 12: Deviazioni percentuale dalle concentrazioni nominali (Acc%) e coefficienti di variazione percentuale (CV%) in urina

Coefficiente di variazione e deviazione standard forniscono il grado di precisione dell'analisi, dando, quindi, un'idea di quanto l'analisi risulti riproducibile; mentre l'affidabilità del metodo si valuta calcolando l'accuratezza percentuale, che indica il discostamento del valore medio fornito dall'analisi rispetto al valore reale (cioè rispetto alla concentrazione nominale dell'analita) rapportato alla concentrazione nominale stessa.

La metodologia analitica finora descritta presenta i requisiti di affidabilità necessari per la rivelazione e la quantificazione di droghe in campioni incogniti di soggetti presumibilmente dediti all'uso di stupefacenti.

3.4 Recupero

Gli esperimenti di recupero sono stati condotti comparando campioni non estratti, che rappresentano il 100% del recupero, con i campioni estratti, contenenti gli analiti a tre diverse concentrazioni (bassa, media, alta), unicamente per la matrice urinaria. Sono quindi state costruite e rapportate tra loro due curve di calibrazione: una in matrice ed una in solvente puro.

Il rapporto tra le pendenze (coefficienti angolari) delle curve di taratura relative al solvente puro ($a_{\text{non estratto}}$) ed alla matrice urinaria

(a_{estratto}) moltiplicato per 100, rappresenta il fattore di recupero medio (Rec%), come riportato in figura 13.

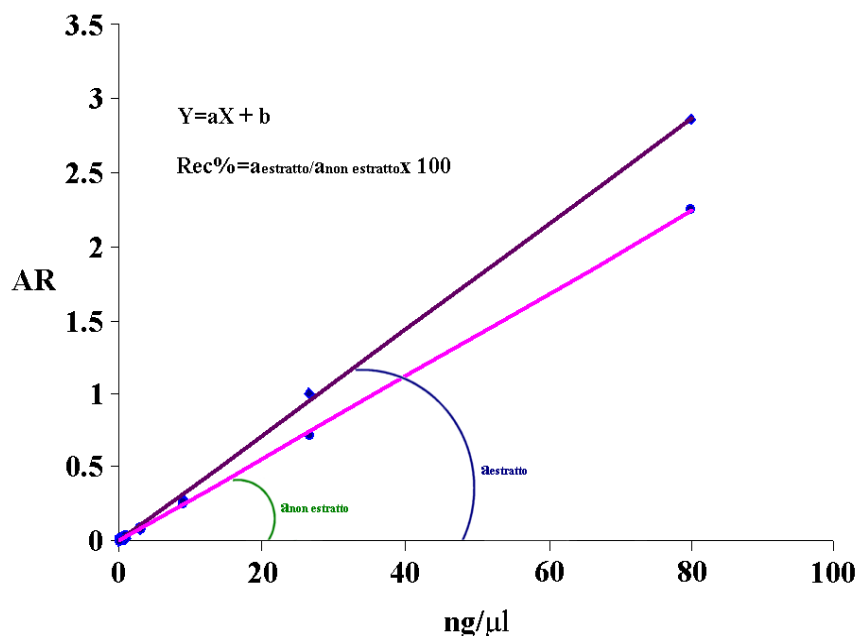


figura 13: Fattore di Recupero medio %

Il concetto di recupero “medio” si basa sulla constatazione che il recupero di un analita da una matrice complessa può variare in maniera rilevante a seconda del livello di concentrazione dell’analita stesso. Adoperare, per la valutazione del recupero, il rapporto tra le pendenze di rette di taratura costruite adoperando tre livelli (alto, medio e basso) di concentrazione, consente di ottenere un valore medio che comprende tutti i livelli di concentrazione considerati.

I recuperi percentuali ottenuti per ciascun analita sono riportati in tabella 13.

Sostanza	Recupero %
<i>Cocaina</i>	33.3
<i>EME</i>	23.5
<i>Benzoilecgonina</i>	100
<i>Cocaetilene</i>	100
<i>Morfina</i>	100
<i>6-MAM</i>	0
<i>Metadone</i>	83
<i>THCCOOH</i>	62.9
<i>Amfetamina</i>	77.4
<i>Metamfetamina</i>	86.2
<i>MDMA</i>	70.6
<i>MDA</i>	68.4

tabella 13: Percentuali di recupero calcolate in base al rapporto tra le rette di taratura

Per la Benzoilecgonina e Cocaetilene sono stati ottenuti recuperi di estrazione del 100% per i metaboliti, mentre per la Cocaina tal quale ed il metabolita Ecgoninametilestere i recuperi di estrazione sono molto bassi. Questo risultato suggerisce la valutazione di ulteriori procedure di estrazione al fine di ottenere percentuali di recupero maggiori. Tuttavia, essendo i valori di cut-off considerevolmente più alti del limite di sensibilità ed avendo ottenuto valori di accuratezza e precisione soddisfacenti per i QC, la metodica è utilizzabile per la quantificazione di campioni urinari risultati positivi a screening immunochimici per la presenza di cocainici. Per gli oppiacei è stato ottenuto un recupero del 100% per la morfina, mentre sono completamente assenti i segnali relativi alla 6-MAM. Questo accade a causa della deacetilazione della molecola

durante la fase di idrolisi acida, come detto in precedenza; inoltre tale dato è confermato dalla rivelazione di morfina-D₆ in campioni in cui era stata addizionata 6-MAM-D₆ come standard interno. Nei campioni utilizzati per la stabilità short term, invece, che non sono sottoposti ad idrolisi, sia la 6-MAM che il suo analogo deuterato sono stati rivelati.

Il suddetto risultato suggerisce l'utilizzo di morfina come indicatore di abuso agli oppiacei, tuttavia, sarà necessario utilizzare un altro metabolita al posto della 6-MAM al fine di discriminare tra l'abuso di eroina o di morfina.

Lo stesso discorso fatto per Cocaina ed EME vale per THCCOOH, MDMA e MDA, che nonostante mostrino recuperi più alti non raggiungono comunque il 75%, valore richiesto nelle Linee Guida della FDA.

3.5 Stabilità

Nell'analisi dei campioni reali è necessario considerare la stabilità delle sostanze durante tutte le fasi della loro manipolazione, ossia nelle condizioni di conservazione sia a lungo termine (temperatura di congelamento) che a breve termine (temperatura della stanza in cui si lavora). Le condizioni per la valutazione delle stabilità devono rispecchiare effettivamente la reale situazione in cui si trovano i campioni durante le fasi di manipolazione e di analisi.

La **stabilità a breve termine** (Short-Term Stability) è stata studiata utilizzando tre soluzioni standard a concentrazioni diverse e suddivise in sei aliquote ciascuna. Tre aliquote per ogni concentrazione e rappresentanti il 100% della stabilità, addizionate dello standard interno, sono state immediatamente analizzate. Le rimanenti aliquote sono state addizionate di standard interno ed analizzate dopo conservazione a temperatura ambiente per 6 h.

La stabilità a temperatura ambiente degli analiti (espressa in percentuale) è stata valutata comparando la risposta analitica delle soluzioni analizzate dopo 6 h rispetto a quella delle stesse soluzioni immediatamente analizzate. L'analisi di soluzioni standard tenute a

temperatura ambiente serve a conoscere la stabilità degli analiti durante le fasi di preparazione, estrazione ed analisi dei campioni.

I risultati ottenuti sono mostrati in tabella 14.

Short-term stability \pm SD (%)			
	A, 54 ng μl^{-1}	B, 18 ng μl^{-1}	C, 6 ng μl^{-1}
<i>Cocaina</i>	106.7 \pm 0.23	101.3 \pm 0.19	106.8 \pm 0.55
<i>EME</i>	98.2 \pm 1.15	72.5 \pm 0.29	71.5 \pm 0.94
<i>Benzoilecgonina</i>	109.8 \pm 0.81	99.4 \pm 0.67	0
<i>Cocaetilene</i>	110.1 \pm 1.42	105.6 \pm 0.55	107.8 \pm 0.82
<i>Morfina</i>	125.1 \pm 0.20	107.7 \pm 1.7	124.8 \pm 1.15
<i>6-MAM</i>	105.6 \pm 0.88	93.3 \pm 0.24	104.1 \pm 0.89
<i>Metadone</i>	97.5 \pm 0.5	86.8 \pm 7.5	107.3 \pm 1.0
	A, 8.1 ng μl^{-1}	B, 2.7 ng μl^{-1}	C, 0.9 ng μl^{-1}
<i>THCCOOH</i>	102.5 \pm 2.24	132.5 \pm 4.53	100.0 \pm 10.06
	A, 90 ng μl^{-1}	B, 30 ng μl^{-1}	C, 10 ng μl^{-1}
<i>Amfetamina</i>	101.6 \pm 2.0	98.4 \pm 0.9	105.4 \pm 1.5
<i>Metamfetamina</i>	94.6 \pm 2.5	96.8 \pm 8.1	95.6 \pm 3.9
<i>MDMA</i>	96.8 \pm 3.6	94.1 \pm 5.2	105.4 \pm 1.7
<i>MDA</i>	94.3 \pm 4.8	94.9 \pm 7.9	103.3 \pm 3.4

tabella 14: Percentuali di recupero degli analiti e deviazioni standard per la valutazione della short-term stability

Come è possibile notare, per ognuna delle tre concentrazioni prese in esame e per ogni sostanza analizzata, non si verificano perdite apprezzabili degli analiti nell'arco delle 6 h, ad eccezione della benzoilecgonina che è stabile alle concentrazioni alta e media, ma si degrada completamente a bassa concentrazione. Per questa sostanza sarà necessario valutare nuovamente la stabilità in altre condizioni di conservazione, ad esempio variando il pH della soluzione.

La **stabilità a lungo termine** (Long-Term Stability) è stata valutata al fine di garantire l'integrità dei campioni durante le fasi di prelievo, trasporto e conservazione dei campioni prima dell'analisi. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando tre diverse concentrazioni urinarie: alta, media e bassa nel range preso in considerazione per ogni classe di sostanze.

Tre campioni per ogni concentrazione e rappresentanti il 100% della stabilità, sono stati immediatamente estratti ed analizzati.

I restanti campioni sono stati conservati in borsa frigo per 6 h, al fine di mimare le condizioni di campionamento e trasporto e poi congelati a -20°C.

Dopo una settimana tre aliquote per ogni concentrazione sono state scongelate, estratte ed analizzate, previa aggiunta dello standard interno.

La valutazione della stabilità a lungo termine è stata effettuata comparando la risposta analitica dei campioni estratti dopo una settimana rispetto a quella dei campioni immediatamente estratti ed analizzati.

Numerosi studi in letteratura dimostrano la permanenza delle sostanze stupefacenti nei capelli nel tempo, per cui gli esperimenti di stabilità Long Term non sono stati condotti per la matrice cheratinica.

In tabella 15 sono riportati i risultati ottenuti in urina.

	Long-term stability ± SD (%)		
	A, 900 ng ml ⁻¹	B, 300 ng ml ⁻¹	C, 100 ng ml ⁻¹
<i>Cocaina</i>	148.0±0.22	143.9±0.81	133.3±0.86
<i>EME</i>	128.5±1.74	79.9±2.72	75.7±0.65
<i>Benzoilecgonina</i>	83.3±1.33	84.1±0.11	91.5±0.57
<i>Cocaetilene</i>	147.9±1.57	134.9±1.1.39	134.4±0.83
<i>Morfina</i>	160.9±1.73	159.8±1.22	156.1±0.57
<i>6-MAM</i>	0	0	0
<i>Metadone</i>	95.6±1.60	93.3±1.20	89.8±0.50
	A, 135 ng ml ⁻¹	B, 45 ng ml ⁻¹	C, 15 ng ml ⁻¹
<i>THCCOOH</i>	108.4±6.71	109.2±10.33	102.3±12.88
	A, 2250 ng ml ⁻¹	B, 750 ng ml ⁻¹	C, 250 ng ml ⁻¹
<i>Amfetamina</i>	74.0±5.2	86.6±5.2	85.4±7.4
<i>Metamfetamina</i>	81.3±1.9	71.7±0.4	87.6±3.2
<i>MDMA</i>	53.0±4.0	66.6±3.5	59.8±5.0
<i>MDA</i>	67.0±7.5	74.9±6.0	46.1±12.2

tabella 15: Percentuali di recupero degli analiti e deviazioni standard per la valutazione della long-term stability

Per i cocainici e per il THCCOOH dopo una settimana, non sono riscontrabili significative perdite di analiti per tutti i campioni presi in esame, infatti, le percentuali di recupero risultano maggiori o uguali al 75.7%; per gli oppiacei, invece, si nota una completa degradazione della 6-MAM ed un contemporaneo recupero della morfina molto superiore al 100% (156.1-160.9%). Questo accade perché il processo di trasformazione, già avviato nella fase di idrolisi acida, come discusso per il recupero di estrazione, risulta completo se il campione non è immediatamente estratto, bensì conservato per una settimana. Questo risultato suggerisce di non utilizzare, in futuro, la 6-MAM come indicatore di abuso di eroina, ma di focalizzare l'attenzione su altri metaboliti come ad esempio la codeina, che si ritrova come impurezza nell'eroina trovata in commercio. Per quanto riguarda il gruppo delle amfetamine, non sono stati riscontrati recuperi soddisfacenti per tutte le molecole ed a tutte le concentrazioni (46.1 ± 12.2 - 87.6 ± 3.2). Questo risultato suggerisce una particolare cura nella fase di campionamento e conservazione dei campioni a causa della fotosensibilità delle amfetamine. E' possibile, infatti, che le molecole siano degradate dalla luce, sarà necessario, quindi, avvolgere le aliquote dei campioni, che risultano positivi, in carta argentata subito dopo la loro sigillatura. Sarà buona norma, inoltre, estrarre ed analizzare questi campioni nel più breve tempo possibile.

3.6 Campioni reali

Nel periodo di tesi sono stati effettuate 33 analisi GC/MS su matrice cheratinica (24 su capelli, 2 su capelli e peli e 7 su peli) e 16 in urina.

Le indagini volte alla ricerca di sostanze stupefacenti in matrice cheratinica, sono state eseguite, nella totalità dei casi, successivamente a richiesta del soggetto interessato per vari motivi quasi sempre legali: affidamento di minori, cause di separazione, idoneità alla guida, idoneità al servizio militare, detenzione in istituti per tossicodipendenti, imputabilità di reato; mentre in taluni casi, le indagini su matrice urinaria sono state eseguite su richiesta di strutture sanitarie al fine di confermare l'ipotesi che i pazienti fossero sotto l'effetto di sostanze stupefacenti al momento di ricovero. In tabella 16 sono riportati i campioni, la matrice, le

sostanze ricercate, l'esito e, dove conosciuta, la finalità delle indagini richieste.

	<i>matrice</i>	<i>sostanze ricercate</i>	<i>esito analisi</i>	<i>Finalità</i>	<i>legislazione</i>
1	capelli	cocaina	positivo	detenzione in istituto per tossicodipendenti	art. 95 d.p.r. 309/90
2	capelli	cocaina	positivo		
3	capelli	cocaina	positivo	detenzione in istituto per tossicodipendenti	art. 95 d.p.r. 309/90
4	capelli	cocaina	negativo		
5	capelli	cocaina	positivo		
6	pelì ascellari	oppiacei	negativo		
7	pelì ascellari	cocaina	positivo	detenzione in istituto per tossicodipendenti	art. 95 d.p.r. 309/90
8	urina	cocaina	positivo	richiesta di struttura sanitaria	
9	urina	cannabinoidi	negativo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64
10	capelli	cocaina	negativo	pratica di separazione	
11	capelli	amfetamina cocaina cannabinoidi	negativo	affidamento minori	art. 155 legge n. 54/06
12	capelli	amfetamina cocaina cannabinoidi	negativo	affidamento minori	art. 155 legge n. 54/06
13	pelì	cocaina	negativo	detenzione in istituto per tossicodipendenti	art. 95 d.p.r. 309/90

14	capelli	cocaina cannabinoidi	positivo	detenzione in istituto per tossicodipendenti	art. 95 d.p.r. 309/90
15	pelì	oppiacei cannabinoidi	negativo		
16	pelì	cocaina	negativo	detenzione in istituto per tossicodipendenti	art. 95 d.p.r. 309/90
17	urina	cannabinoidi	positivo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64
18	urina	cannabinoidi	negativo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64
19	capelli	cocaina	negativo	detenzione in istituto per tossicodipendenti	art. 95 d.p.r. 309/90
20	capelli	cocaina	positivo		
21	capelli	cocaina	negativo		
22	pelì	cocaina	negativo	detenzione in istituto per tossicodipendenti	art. 95 d.p.r. 309/90
23	capelli	cocaina	positivo	detenzione in istituto per tossicodipendenti	art. 95 d.p.r. 309/90
24	capelli	oppiacei	positivo		
25	capelli	cocaina cannabinoidi	positivo		
26	capelli	cannabinoidi	negativo	possesso sostanze stupefacenti	d.p.r. 309/90
27	capelli	cocaina	positivo	detenzione in istituto per tossicodipendenti	art. 95 d.p.r. 309/90
28	capelli	cocaina	positivo		
29	pelì	cocaina	positivo	detenzione in istituto per	art. 95 d.p.r.

				tossicodipendenti	309/90
30	peli	cocaina	negativo	detenzione in istituto per tossicodipendenti	art. 95 d.p.r. 309/90
31	peli	cocaina	positivo	detenzione in istituto per tossicodipendenti	art. 95 d.p.r. 309/90
32	capelli	cocaina	positivo		
33	capelli	cocaina cannabinoidi	negativo	pratica di separazione	
34	capelli	amfetamina cannabinoidi	negativo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64
35	capelli	cocaina	negativo		
36	capelli	cocaina	positivo	detenzione in istituto per tossicodipendenti	art. 95 d.p.r. 309/90
37	capelli	cannabinoidi	positivo	imputabilità di reato	art. 85 c.p.
38	urina	metadone	positivo	richiesta di struttura sanitaria	
39	urina	cannabinoidi	positivo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64
40	urina	oppiacei	negativo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64
41	urina	cannabinoidi	positivo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64
42	urina	metadone	negativo	richiesta di struttura sanitaria	
43	urina	cannabinoidi	positivo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64
44	urina	cannabinoidi	positivo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64
45	urina	cannabinoidi	positivo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64
46	urina	cannabinoidi	positivo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64

47	urina	cannabinoidi	positivo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64
48	urina	oppiacei	negativo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64
49	urina	amfetamine	negativo	idoneità al servizio militare	d.p.r. 496/64

tabella 16: analisi svolte per la determinazione di sostanze stupefacenti

Durante il periodo di tesi sono state eseguite, anche indagini volte agli accertamenti di assenza di assunzione di sostanze stupefacenti e/o psicotrope in lavoratori con mansioni a rischio.

In particolare sono stati effettuati 145 tests di screening su campioni di urina estemporanei.

I risultati di questi test hanno mostrato 9 casi di presunta positività ad uno o più analiti, di cui 8 sono stati confermati mediante analisi in GC/MS, mentre in un campione è stata accertata la presenza dell'acido 11-nor-THC-9-carbossilico ad una concentrazione al di sotto del cut-off, per cui il risultato dell'analisi è da considerare legalmente negativo.

Sono state effettuate, inoltre, per richiesta di laboratori esterni, 38 analisi di sola conferma di campioni provenienti da altri laboratori. Il risultato dell'analisi di questi campioni ha svelato una falsa positività in 11 casi: quattro alle amfetamine, quattro agli oppiacei, tre ai cannabinoidi.

Dalle informazioni raccolte attraverso i verbali di prelievo si evince che i lavoratori indagati svolgevano principalmente la mansione di autisti, manovratori di gru o scavatrici, con un'età compresa tra i 19 ed i 63 anni e si evidenzia una differenziazione nel tipo di droga utilizzata ed una relazione tra il tipo di sostanze assunte ed età media dell'assuntore. Considerando, infatti, le informazioni relative solo a coloro che sono risultati dediti all'uso di stupefacenti, le droghe rivelate nelle urine dei lavoratori sono state: cannabis per il 76%, cocaina per il 18%, metadone per il 2%, oppiacei per il 2% e una combinazione di cannabis e cocaina per il 2% dei casi. L'analisi dei risultati, inoltre, ha evidenziato una differenza nell'età media degli assuntori di cannabis e cocaina. I consumatori di cannabis, infatti, risultano essere mediamente più giovani rispetto agli assuntori di cocaina, con età media, rispettivamente, di 23.81 e 33.43 anni.

Nonostante nella casistica fin qui raccolta il numero di falsi positivi riscontrati sia basso, sulla base dei risultati delle successive analisi di conferma si possono trarre considerazioni significative. Nei quattro casi in cui si è riscontrata una presunta positività alle amfetamine e in due dei quattro casi di probabile positività agli oppiacei, è stato ripetuto lo screening con diversi kit immunoenzimatici, ottenendo comunque la positività, dato confutato, però, dall'analisi GC/MS.

Pertanto, la *falsa positività* è riconducibile ad una reattività crociata dell'immunotest con interferenti presenti nella matrice urinaria e, quindi, ad un limite intrinseco del metodo stesso.

Nel terzo caso di falsa positività agli oppiacei, l'esito non corretto del test è stato attribuito ad un'erronea valutazione da parte di colui che ha effettuato lo screening. Ripetendo, infatti, il test in laboratorio con diversi kit immunoenzimatici, oltre che dalla successiva analisi GC/MS, il risultato di positività non è stato mai confermato.

Verosimilmente, in sede di screening l'operatore non aveva atteso il tempo necessario affinché il riconoscimento immunoenzimatico avesse luogo.

In tutti i casi di falsa positività al THC e nel quarto caso riguardante gli oppiacei, gli analiti erano realmente presenti, ma sotto i valori di cut-off.

CONCLUSIONI

I metodi proposti per la determinazione delle sostanze stupefacenti mostrano livelli di elevata sensibilità e specificità, senza sottovalutare altri vantaggiosi aspetti quali rapidità e relativa semplicità dell'analisi. Tutti questi fattori garantiscono l'effettiva applicabilità delle metodiche proposta e quindi la possibilità di effettuare analisi routinarie di campioni su vasta scala.

Le tecniche adottate si rivelano un proficuo strumento di indagine applicabile agli ambiti più svariati: da quello più vasto della ricerca, teso ad esempio a chiarire i meccanismi di incorporazione delle droghe nelle matrici cheratiniche; a quello sociale riguardante sia studi epidemiologici in diversi campioni di popolazione per stimare la diffusione del fenomeno sia l'applicazione dell'analisi alla terapia di disintossicazione; a quello tossicologico-forense che necessita di validi strumenti di analisi in grado di fornire risultati inequivocabili.

Le metodiche analitiche descritte rappresentano, quindi, un valido sistema per monitorare categorie a rischio, il cui lavoro implica elevata responsabilità nei confronti della collettività, come ad es. piloti o autisti di mezzi pubblici per dimostrare la responsabilità di individui colpevoli di aver causato gravi incidenti stradali.

In questo lavoro di tesi è stato messo a punto un protocollo per gli accertamenti tossicologici di lavoratori adibiti a mansioni a rischio, ponendo particolare attenzione al rispetto della normativa, nonché alle metodiche analitiche per la verifica dell'assenza di assunzione di sostanze stupefacenti e/o psicotrope.

Il protocollo operativo elaborato per la raccolta, conservazione ed analisi dei campioni, consente in ogni momento la rintracciabilità degli stessi e di tutte le manipolazioni su di essi eseguite. La raccolta del campione è fatta nel rispetto della privacy del lavoratore, non consentendo, d'altra parte l'adulterazione della matrice da sottoporre ad analisi.

Le metodiche analitiche adoperate, pur non rispecchiando i requisiti di validazione proposti dalla FDA, consentono con sufficiente

accuratezza e precisione l'identificazione e la quantificazione degli analiti indagati.

L'intera metodica è stata applicata con successo a 145 accertamenti di assenza di tossicodipendenza, dimostrando, ulteriormente, la sua adeguatezza ai criteri previsti dalla legge.

BIBLIOGRAFIA

1. Legge n. 685 del 22.12.1975 disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope (G.U. n. 342 del 30.12.1975).
2. C. Baccini. *Le droghe d'abuso*. MEDICAL SYSTEM s.p.a.
3. E. Bertol, F. Mari, F. Lodi, E. Marozzi. *Trattato di tossicologia forense*. II edizione (2000), CEDAM.
4. Goodman & Gilman. *Le basi farmacologiche della terapia*. IX edizione (2000) Mc Graw-Hill Libri Italia s.r.l.
5. Marco Faccio, Giovanni Serpelloni. *Clinica dei disturbi psichici correlati al consumo di cocaina e criteri diagnostici*.
6. G. Quaglio, F. Lugoboni, B. Pajusco, A. Fornasiero, P. Mezzelani, A. Lechi. *Manifestazioni cliniche associate all'uso di cocaina* (Ann Ital Med Int 2004; 19: 291-303).
7. Franjo Grotenhermen. *Cannabinoidi e Sistema Endocannabinoide*. Cannabinoids -Vol 1, No 1 -17 Settembre 2006.
8. O. Mariotti. *Droghe e lavoro*. G Ital Med Lav Erg 2004; 26:3
9. D.P.R. n. 309 del 9.10.1990 Testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza (*Suppl. Ord. n. 67 alla G.U. n. 255/1990*).
10. DL.vo n.230 del 22.06. 1999 Riordino della medicina penitenziaria a norma dell'articolo 5, della legge legge 30 novembre 1998, n. 419 (*Suppl. Ord. n. 132 alla G.U. n. 165 del 16.7.1999*).
11. Dl.vo n. 285 del 30.04.1992 Nuovo codice della strada (*Suppl. Ord. alla G.U. n. 114 del 18.05.1992*).
12. D.L. 3 n. 117 3 agosto 2007 disposizioni urgenti modificative del codice della strada per incrementare i livelli di sicurezza nella circolazione (G.U. n. 180 4.08.2007)
13. Legge n. 160 2 ottobre 2007 Conversione in legge, con modificazioni, del

decreto-legge 3 agosto 2007, n. 117, recante disposizioni urgenti modificative del codice della strada per incrementare i livelli di sicurezza nella circolazione (*G.U. n. 230 del 3.10.2007*)

14. Decreto Legge n. 92 23 maggio 2008, Misure urgenti in materia di sicurezza pubblica (*G.U. n. 122 del 26.05.2008*)
15. Protocollo operativo per gli accertamenti richiesti all'art 187 del DL.vo 30.4.1992 n. 285 e successive modificazioni sui conducenti che si presume siano in stato di alterazione psico-fisica conseguente all' uso di sostanze stupefacenti o psicotrope. Versione 2.2 - febbraio 2005
16. D.P.R. n. 496 del 28.05.1964 Approvazione dell'elenco delle imperfezioni e delle infermità che sono causa di non idoneità al servizio militare (*G.U. n. 166 del 9.07.1964*)
17. Legge n. 54 del 8.02.2006 Disposizioni in materia di separazione dei genitori e affidamento dei figli (*G.U. n. 50/2006*)
18. R.D. n. 1398 del 19.10.1930 Codice Penale Libro I Titolo IV Del reo e della persona offesa dal reato (*G.U. n. 253 del 28.10.1930*)
19. R. D. n. 230 del 18.06.1899 Regolamento generale per la prevenzione degli infortuni.
20. R. D. n. 231 del 18.06.1899 Regolamento generale per la prevenzione degli infortuni nelle cave e nelle miniere.
21. R.D. n. 232 del 18.06.1899 Regolamento generale per la prevenzione degli infortuni nelle imprese e nelle industrie che trattano o applicano materie esplosive (*G.U. n. 148 del 26.06.1899*).
22. Provvedimento n. 99/cu del 30.10.2007 Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131, in materia di accertamento di assenza di tossicodipendenza (*G.U. n. 266 del 15.11.2007*).
23. Provvedimento n. 178/csr del 18.09.2008 Accordo, ai sensi dell'articolo 8, comma 2 dell'Intesa in materia di accertamento di assenza di tossicodipendenza, perfezionata nella seduta della Conferenza Unificata del 30 ottobre 2007 (*G.U. n. 236 dell' 8.10.2008*).
24. Deliberazione n. 1448 del 11.9.2009 Recepimento Protocollo operativo per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di

- terzi ai sensi dell'intesa Stato/Regioni (provvedimento n. 99/CU del 30.10.2007) e dell'Accordo Stato/Regioni (rep. atti n. 178 del 18.9.2008). (*Bollettino Ufficiale della Regione Campania n. 58 del 28.09.2009*).
25. S. Pichini, P. Zuccaro, M. Pellegrini, a. Lopez, R. Pacifici. *L'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nella matrice cheratinica* Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000).
 26. V. Cellesi, E. Bertol, M.G. Di Milia, M. Meini, C. Trignano, F. Mari. *Analisi comparativa di capelli, peli ed unghie per la ricerca delle droghe d'abuso in soggetti afferenti ad un ser.t. della Toscana*.
 27. D.A. Kidwell, D.L. Blank. *Mechanisms of incorporation of drugs into hair and the interpretation of hair analysis data*. In: *Hair testing for drugs of abuse. International research on standards and technology*. National Institute on Drug Abuse, Rockville, MD. (NIDA Research Monograph, NIH Publication, no. 95-3727). (1995) pp. 19-90.
 28. M.R. Harkey, G.L. Henderson. *Hair analysis for drugs of abuse*. In: *Advances in analytical toxicology*. Vol. II, R.C. Baselt eds. (1989).
 29. M.R. Moeller, P. Fey, H. Sachs. *Hair analysis as evidence in forensic cases*. *Forensic Sci. Int.* 63: 43-53 (1993).
 30. P. Kintz, A. Tracqui, P. Mangin. *Detection of drugs in human hair for clinical and forensic applications*. *Int. J. Leg. Med.* 105: 1-4 (1992).
 31. L. Pötsch, G. Skopp, M.R. Moeller. *Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation*. *Forensic Sci. Int.* 84: 25-35 (1997).
 32. Commissione Qualità del Gruppo Tossicologi Forensi Italiani. *Linee guida per i laboratori di analisi delle droghe d'abuso con finalità medico legali*. Revisione n. 2, maggio 2008.
 33. Guidance for Industry-Bioanalytical Method Evaluation. www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm

ABBREVIAZIONI

Acc%: deviazione percentuale dalle concentrazioni nominali

AVT: area ventrale del tegmento

BSTFA: N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide

BE: benzoilecgonina

CBC: cannabicromene

CBD: cannabidiolo

CBG: cannabigerolo

CBN: cannabinolo

CV%: coefficiente di variazione percentuale

EI: ionizzazione elettronica

EME: ecgoninametilestere

FDA: Food and Drug Administration

GC: gas cromatografia

IS: standard interno

6-MAM: 6-monoacetilmorfina

MAO: monoamminossidasi

MC: medico competente

MDA: 3,4-metilendiossiamfetamina

MDEA: 3,4-metilendiossietilamfetamina

MDMA: 3,4-metilendiossimetilamfetamina

MS: spettrometria di massa

OMS: Organizzazione Mondiale della Sanità

QC: Quality Control

R²: coefficiente di correlazione

Rec%: recupero percentuale medio

RT: tempo di ritenzione

SD: deviazione standard

SERT: Servizi per le tossicodipendenze

SIM: scansione di ioni selezionati

S.N.C.: Sistema Nervoso Centrale

SPE: estrazione in fase solida

SPME: microestrazione in fase solida

Δ 9-THC: Δ 9-tetraidrocannabinolo

Δ 8-THC: Δ 8-tetraidrocannabinolo

THC-COOH: acido 11-nor-THC-9-carbossilico

TIC: corrente ionica totale

TMCS: trimetilclorosilano