

Chimica Analitica Forense

## DETERMINAZIONE DI DROGHE D'ABUSO IN FLUIDI BIOLOGICI

---

---

---

---

---

---

---

---

### Chimica Analitica Forense

- Le analisi sono volte a classificare le varie sostanze, identificarle, per poi poter fare associazioni (*linking*) e quindi ricostruire gli avvenimenti, secondo i principi che sono alla base della criminalistica
- Le più importanti classi di sostanze, di grande attualità, che ben inquadrano l'attività del chimico forense sono due: esplosivi e stupefacenti.

---

---

---

---

---

---

---

---

### Classificazione delle sostanze stupefacenti

- Oppiacei
- Cocaina
- Anfetamine
- Allucinogeni



---

---

---

---

---

---

---

---

### Classificazione delle sostanze stupefacenti

- L'*oppio* ed i materiali da cui possono essere ottenute le sostanze oppiacee naturali, estraibili dal *papaver somniferum*; gli alcaloidi ad azione narcotico-analgésica 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.
- 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
- Le sostanze di tipo anfetaminico ad azione eccitante sul sistema nervoso centrale.
- Gli indolici, siano essi derivati triptaminici che lisergici, e i derivati feniletilamminici, che abbiano effetti allucinogeni o che possano provocare distorsioni sensoriali.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Classificazione delle sostanze stupefacenti

- I derivati della *cannabis indica*: tetraidrocannabinoli ed i loro analoghi.
- Le sostanze di tipo barbiturico che abbiano notevole capacità di indurre dipendenza fisica o psichica o ambedue, nonché altre sostanze ad effetto ipnotico-sedativo ad esse assimilabili.
- Le sostanze di corrente impiego terapeutico, per le quali sono stati accertati concreti pericoli di induzione di dipendenza fisica o psichica di intensità e gravità minori
- 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

---

---

---

---

---

---

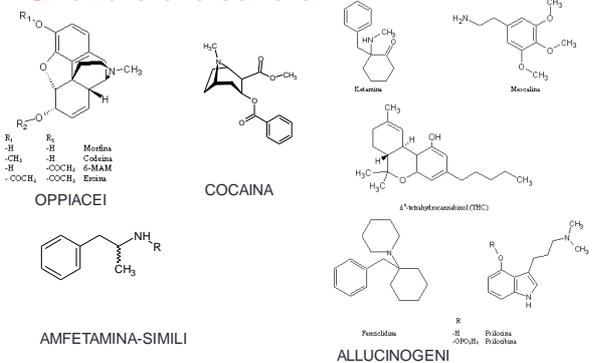
---

---

---

---

### Strutture di alcune droghe




---

---

---

---

---

---

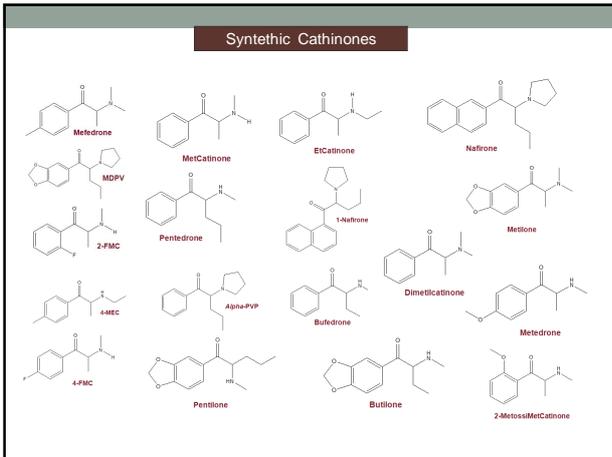
---

---

---

---





---

---

---

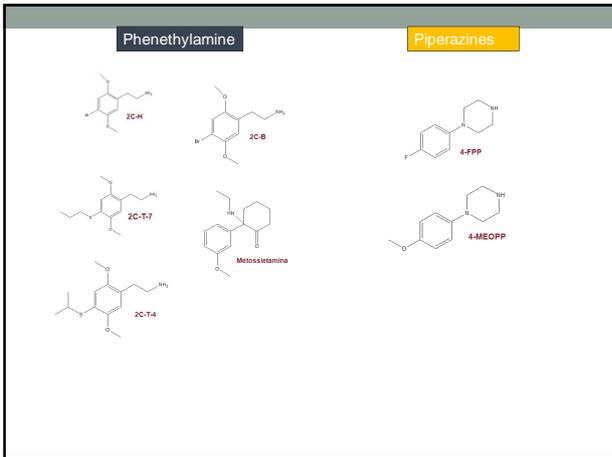
---

---

---

---

---



---

---

---

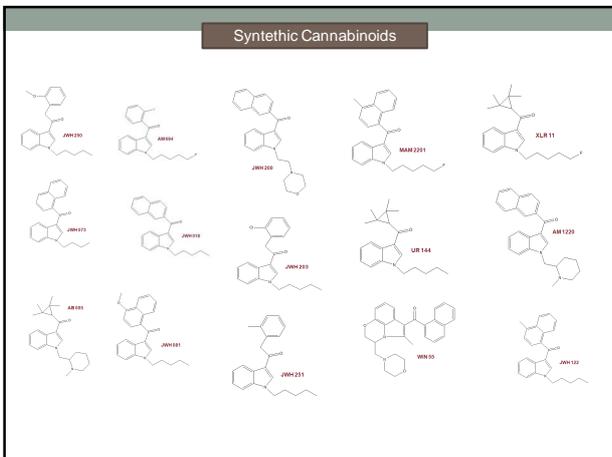
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---

Analitica 2015 - Trieste 13

## BIOLOGICAL MATRICES

<p><b>CONVENTIONAL</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plasma/Serum</li> <li>- Urine</li> </ul>	<p><b>NON-CONVENTIONAL</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hair</li> <li>- Oral fluids (OF)</li> </ul>
--	---

13

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Uso delle sostanze stupefacenti

- Dall'uso elitario della cocaina al consumo diffuso
- Il consolidamento del consumo di allucinogeni, cannabis su tutti
- La diffusione delle anfetamine e dell'eroina negli anni '70 alla comparsa nei primi anni '90 delle cosiddette 'droghe da discoteca' (associazioni di sostanze psicoattive, stimolanti e allucinogeni)
- La continua immissione sul mercato di nuove sostanze di sintesi (*designer-drugs*) sia per attrarre consumatori sia per eludere i controlli giudiziari che possono intervenire solo su sostanze già conosciute e tabellate

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

- Le droghe d'abuso sono una minaccia sociale:

➔ Aumento di incidenti stradali dovuti alla guida sotto l'influenza di stupefacenti (i cosiddetti **DUIDS**: *Driving Under Influence of Drugs*)

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### La Legislazione

- In Italia vige il "Testo unico in materia di stupefacenti" 309/90 e successive reVISIONI.
- prevede una divisione delle sostanze oggetto d'abuso in tabelle e per ogni sostanza viene indicato un valore quantitativo (la "dose media massima giornaliera" - art.75)
- le tabelle quindi sono soggette ad assidui aggiornamenti da parte del Ministero della Giustizia di concerto con il Ministero della salute.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### La Legislazione

- Il Nuovo Codice della Strada vieta (art. 187 e successive modificazioni): la guida "in condizioni di alterazione psicofisica correlata con l'uso di sostanze stupefacenti o psicotrope" e impone alle Forze di Polizia, in caso di incidente o quando supportato da ragionevoli motivazioni, l'accertamento del reato di guida sotto l'effetto di stupefacenti (DUID) sottoponendo il soggetto al prelievo di sostanze biologiche, dalla cui analisi dipenderà poi la sanzione

---

---

---

---

---

---

---

---

### Analisi chimica delle droghe d'abuso in matrice biologica

- Screening preliminare utilizzando metodi molto praticabili (anche da personale senza conoscenze specifiche) per differenziare i campioni positivi nel minor tempo possibile
- Tali metodi devono essere volti a limitare l'errore di falsi negativi al di sotto di una soglia prestabilita
- Esistono in commercio numerosi kit immunochimici atti allo scopo

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Analisi chimica delle droghe d'abuso in matrice biologica

- Analisi di conferma qualitativa e quantitativa con una separazione cromatografica seguita da una rilevazione mass-spettrometrica
- Con la spettrometria di massa si riesce ad ottenere una sorta di "impronta digitale chimica" della sostanza anche a concentrazioni molto basse, consentendo un risultato legalmente valido ed inequivocabile
- Ottenimento di un maggior numero di punti di identificazione, una misura della specificità del metodo nei confronti di una data sostanza.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Analisi chimica delle droghe d'abuso in matrice biologica

Tecnica/che	Numero di ioni	Punti di identificazione
GC-MS (EI o CI)	N	n
GC-MS (EI e CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI o CI) 2 derivati	2 (Derivato A) + 2 (Derivato B)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 precursore e 2 figlie	4
LC-MS-MS	1 precursore e 2 figlie	4
GC-MS-MS	2 ioni precursori, ciascuno con 1 figlia	5
LC-MS-MS	2 ioni precursori, ciascuno con 1 figlia	5
LC-MS-MS-MS	1 precursore, 1 figlia e 2 nonne	5,5
HRMS	N	2 n
GC-MS e LC-MS	2 + 2	4
GC-MS e HRMS	2 + 1	4

Esempi di punti di identificazione ottenuti da alcune tecniche analitiche

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## GC-MS per l'analisi di droghe

- La gas-cromatografia con rilevazione di massa è da molto tempo il metodo di riferimento
- Le metodiche GC-MS necessitano di derivatizzazione per molti analiti (i.e. le anfetamine, BEG e molti barbiturici) altrimenti instabili ad alte temperature o non rilevabili
- La derivatizzazione aumenta il costo totale del metodo oltre che il tempo di analisi
- Possibilità di introduzione di grandi errori nelle analisi e perdita di riproducibilità

---

---

---

---

---

---

---

---

## LC-MS per l'analisi di droghe

- La LC-MS s'è dimostrata un potente mezzo di indagine nell'ambito forense:
  - per l'analisi di tracce, vista la grande sensibilità anche in presenza di quantità minime di campione
  - analisi di agenti chimici, esplosivi o coloranti
  - droghe d'abuso in campioni biologici o analisi tossicologiche sistematiche

---

---

---

---

---

---

---

---

## Pretrattamento del campione

- Il pretrattamento del campione è uno step critico della metodica analitica, che richiede un'attenta ottimizzazione per minimizzarne il contributo di errore al dato analitico finale.
- Per esempio un'estrazione che preveda una fase di evaporazione può causare perdita di campioni basso bollenti (i.e. le anfetamine)
- Per separare gli analiti dalla matrice è indispensabile conoscerne composizione e proprietà chimiche.

---

---

---

---

---

---

---

---

## L'analisi chimica in matrici biologiche

- Matrici biologiche convenzionali per la determinazione di droghe d'abuso
  - plasma e urine
- Saliva: fisiologia e trasferimento di sostanze

---

---

---

---

---

---

---

---

## Matrici biologiche convenzionali

- Conoscere la concentrazione plasmatica delle sostanze stupefacenti è necessario per poter dare una valida interpretazione tossicologica al dato analitico
- L'invasività del prelievo e la ridotta quantità di volume sono gli svantaggi principali
- Per l'urina si perde la correlazione concentrazione-effetto
- Il volume a disposizione è maggiore, così come la finestra temporale di determinazione e maggiore è anche la concentrazione di analiti (fino a 100 volte quella di plasma), tuttavia può essere facilmente adulterata

---

---

---

---

---

---

---

---

## Matrici biologiche non convenzionali

- Capelli, saliva o sudore hanno dalla loro la possibilità di un prelievo non invasivo
- Nel caso del capello, un allargamento della finestra di rilevazione da ore, giorni a mesi
- L'analisi va incontro a difficoltà quali ad esempio la robustezza della matrice cheratinica
- Per la saliva la variabilità di pH salivare, il volume davvero ristretto di campione possono rappresentare un problema

---

---

---

---

---

---

---

---

### L'analisi in plasma

- Il plasma è la parte liquida del sangue, composta dal 93% di acqua ed il 7% tra proteine in sospensione, elettroliti inorganici, e molecole organiche: nutrienti (glucosio o lipidi), ormoni, prodotti del metabolismo, anidride carbonica ed ossigeno
- Il pH fisiologico è in media 7,4 sotto stretto controllo mediante sistema tampone del sangue ( bicarbonato-acido carbonico – emoglobinato-emoglobina – fosfato basico-fosfato acido), diffusione ed eliminazione dell'anidride carbonica con la ventilazione polmonare, escrezione renale di ioni idrogeno.
- Le proteine plasmatiche, albumine (ne rappresentano il 60% circa), globuline e fibrinogeno, rappresentano un problema nell'analisi chimica in quanto ad esse si legano molte molecole, droghe d'abuso incluse.
- E' necessario rompere i legami con le proteine plasmatiche prima della determinazione analitica

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### L'analisi in saliva

- La saliva è composta per il 99% circa da acqua, in cui sono disciolti costituenti inorganici (ioni sodio, potassio, calcio, magnesio, bicarbonato, fosfato, fluoro e tiocianato), sostanze organiche, cellule di sfaldamento dell'epitelio orale e alcuni microrganismi.
- La composizione della saliva può variare continuamente a seconda della secrezione. Il flusso va da 0.05 (nel sonno) fino a 6 ml/min ed è soggetto a molti stimoli: stimoli meccanici (chewing-gum), stimolazione acida e qualsiasi stimolazione intensa del sistema nervoso centrale (emozioni, paura, stress)
- Il pH nella saliva a riposo è inferiore a quello plasmatico e leggermente acido, varia tra 5,8 e 6,4, mentre a seguito di stimolazione aumenta fino ad un massimo di 7.8-8.0
- Il passaggio di sostanze dal plasma alla saliva risente molto della variabilità del pH

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Validazione

- Linee guida SOFT-AAFS (*Society Of Forensic Toxicology – American Academy of Forensic Science*)
- I parametri sono: precisione, accuratezza, recupero, LOD e LOQ, calibrazione, specificità

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Accreditamento SINAL

In base alla norma **UNI CEI EN ISO/IEC 17025**, il laboratorio deve "utilizzare apparecchiature, impianti ed ambienti idonei per la effettuazione delle prove previste; adottare metodi e procedure di prova adeguati. La Direzione deve salvaguardare la qualità del lavoro, cioè assicurare che le apparecchiature siano tarate, identificate e impiegate in modo appropriato; che i campioni da provare siano adeguatamente catalogati ed immagazzinati; che i risultati siano registrati; che i Rapporti di Prova siano redatti secondo i requisiti richiesti e che la documentazione sia conservata e rintracciabile."

---

---

---

---

---

---

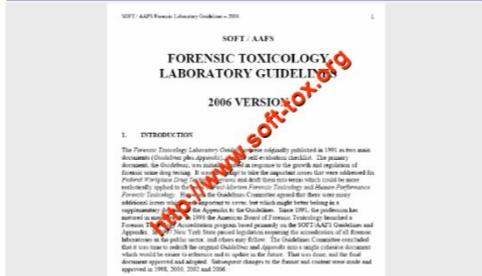
---

---

---

---

### Linee Guida



---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Linee guida SOFT-AAFS

- The use of mass spectrometry is recommended as the confirmatory technique. For example, detection of an analyte by immunoassay and 'confirmation' by GC/NP or GC/FID does not generally provide sufficient specificity for prosecution of a criminal case.
- It is a good practice to confirm the identity of an analyte in a different extract of the same specimen from that used for the first test, or in a second specimen. However, confirmation of a drug or toxin in the same original extract of a single specimen would not normally be regarded as acceptable, since that would not rule out the possibility that the extract became contaminated during the extraction or that the wrong sample was tested.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Linee guida SOFT-AAFS

- When conducting analyses, laboratories may group specimens into batches. Each batch should contain a sufficient number of calibrators and controls, the total number of which will depend on the size of the batch and the nature of the tests.
- Appropriate matrix-matched calibrators should, when possible, be prepared and tested concurrently with the specimens.
- The use of a suitable internal standard for all chromatographic assays is recommended. The internal standard should have chemical and physical properties as similar to the analyte as possible.
- Stable isotope (e.g. deuterated) standards are recommended for GC/MS and LC/MS assays, although well chosen non-deuterated internal standards may occasionally give equivalent or better performance.

---

---

---

---

---

---

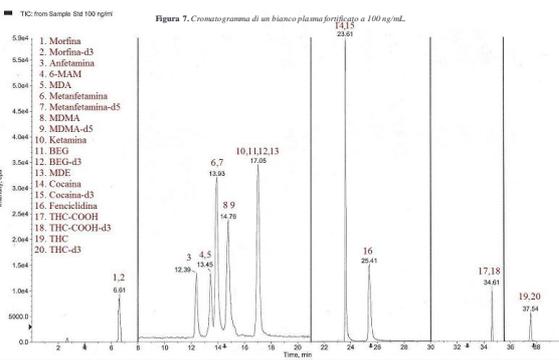
---

---

---

---

## Metodiche innovative: LC-MS/MS




---

---

---

---

---

---

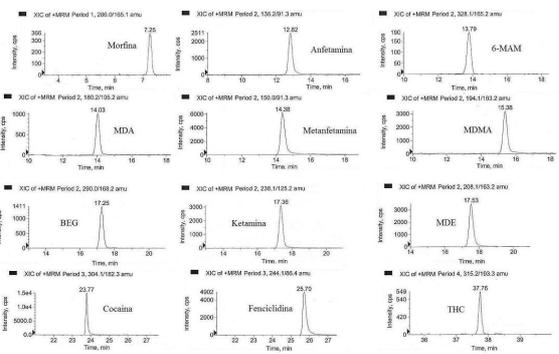
---

---

---

---

## Correnti ioniche estratte (XIC)




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

