

Università degli Studi della Tuscia



Dottorato di Ricerca in Evoluzione Biologica e Biochimica

XXVII CICLO

“ Bioanalytical Method Validation”

Applicazione di un metodo di validazione per l’analisi di droghe d’abuso su matrice urinaria

Settore scientifico disciplinare BIO/02

Coordinatore

Prof.ssa Laura Zucconi

Tutori

Prof. Silvano Onofri

Dipartimento di Scienze

Ecologiche e Biologiche

Dottoranda : Dr.ssa Maria Giovagnoli

Dr.ssa Maria Luisa Capuano

Ospedale “Belcolle” ASL VT

Laboratorio di Farmacotossicologia

Anno Accademico 2013/2014

INDICE

ABSTRACT	p. 3
RIASSUNTO	p. 7
PREMESSA	p. 11
1. INTRODUZIONE	p. 12
1.1 Il Laboratorio di tossicologia forense nell'ambito della diagnostica medico-legale	p. 14
1.1.1 Normative	p. 15
1.1.2 Il Campione Biologico	p. 17
1.1.3 Lo spettrometro di massa: razionale per la ricerca in ifenazione	p.25
1.2 Le tecniche Cromatografiche	p. 32
1.2.1 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	p. 35
1.2.2 Gas cromatografia	p. 38
1.3 La ifenazione	p. 42
1.3.1 La Spettrometria di Massa	p. 45
1.3.2 Tecniche di ionizzazione	p. 51
1.3.3 Analizzatori	p. 57
1.3.4 Modalità di acquisizione dei dati	p. 65
1.3.5 Effetti di vecchie e nuove droghe	p. 67
2. SCOPO DEL DOTTORATO	p. 71
3. MATERIALI E METODI	p. 72
4. RISULTATI	p. 86
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	p. 108
6. BIBLIOGRAFIA	p. 110
7. APPENDICE	p. 123

ABSTRACT

The present work arose from experiences and studies carried out during a PhD course at the UOC Toxicology Clinical Analysis Laboratory of the Hospital of Belcolle, ASL Viterbo.

In particular, we developed the validation method applied in the research of many analytes in the urine matrix, indicating the presence of even the lowest traces of these, in the screening of addiction substances.

The first part of the paper describes the daily activities of a forensic toxicology laboratory diagnostics in the field of forensic medicine, current Regulations and the Guidelines and Standards for ISO certification. Essentially it follows the process undergone by the sample organic: from its choice for the collection and to the chain of custody, that guarantee of the genuineness of the procedures from all points of view. In reference to the real Chemical and Toxicological Analysis I will refer to the choice of the type of analysis, distinguishing those of the first screening (immunochemical methods) from those of acknowledgment (gas chromatography and liquid chromatography coupled with mass spectrometry) which specifically concern my work. Having therefore fixed the reference standard and tested the sensitivity, the cut-off is detected, i.e. the process of exclusion of the samples that do not contain substances or their metabolites or which have a concentration below the threshold concentration. The comparison with the reference standard in the dyadic relationship with the quality controls contribute to the validation of analytical data that is submitted to Reporting and transmission of the data. The core of my thesis is devoted mostly to the coupling or ifenation of gas chromatography and / or high- performance liquid chromatography with mass spectrometry (GC / MS - HPLC/MS), which has significantly extended the applications of both techniques. The high sensitivity also allows the identification and dosage of traces of compounds not otherwise identifiable in very complex mixtures.

This limit of detection (identification) is then the lowest concentration that allows to assess the presence or absence of an analyte qualitatively and is indicated with the term LOD (Limit of Detection) and must be determined in each laboratory in reference to the instrumentation which is being used. The limit of quantification (LOQ - Limit of Quantitation) is the lowest concentration of analyte that can be calculated with predetermined precision and accuracy, generally considering the signal attributed to the analyte wich is about 10 times higher than the standard deviation of the blank.

However, the laboratory does not only provides an analytical result, but the output of the data is conditioned by a series of chemical- toxicological assessments that can be performed only by those with experience and the necessary know how. What is required to Forensic Toxicologist is in fact the interpretation of the analytical data obtained; the interpretation regards the meaning of the positivity or negativity in relation to a series of parameters such as the type of biological sample examined and the analytical techniques used. Because of the changes in the field of drug abuse, control programs and collaboration with other laboratories are needed in order to continuously update and optimize the analytical procedures.

The mass spectrometer enhances the detection method although showing a destructive process . It can be associated with the liquid chromatograph for the detection of addiction substances . The operating principle is

simple enough : the sample is introduced into a chamber where it is ionized and fragmented. These electrically charged fragments are made to migrate , and their rate of division will be based on the ratio molecular weight / charge . The detectors for signal transduction will do the rest obtaining spectrograms useful for conclusions. In the second part of the PhD, it has been emphasized the technical aspect of the equipment supplied. The sample is introduced in such a way that inside the chamber the vacuum is ensured. This is fragmented and ionized by the ionizer. In our case it is an electron-impact ionisation (ESI) : an incandescent filament of tungsten, produces electrons, travelling towards an anode situated opposite. This acceleration makes the electrons travelling at a very high energy (70 eV) . Since to ionize a molecule an energy of 13-14 eV is required , the analyte is not only ionized but also fragmented.

The fragments eventually reach the analyzer . Actually we will examine all the methods of ionization and all type of analyzers common in laboratory practice investigations.

In other words, there are different types of analyzers, but in our case for the ionization a quadrupole analyzer is used and a deeper analysis has been devoted to it, with respect to structure and function. This consists of four molybdenum metal bars that surround the path taken by the ions in the path between the ionizer and the detector.

During this journey , the electromagnetic potential of the bars is kept oscillating , or if in the moment T0 two bars are positive and two are negative , the positive T1 instantly becomes negative and *vice versa*. Acting on the frequency of these oscillations , the fragments will move with a sinusoidal path toward the detector. So these fragments will move at a speed according to the charge and molecular weight. The signal from the photomultiplier (the detector) , is processed by a computer which will be able to use the signal to track the mass spectrum.

At our Toxicology laboratory HPLC-ESI-MS/MS tests are performed using a UltiMate 3000 UHPLC system of DIONEX with remote control (via management software instrument or its override) , equipped with auto sampler thermostatically controlled and a module for the ' housing of the analytical column also with thermostat. The UltiMate 3000 HPLC system offers UHPLC compatibility across all modules , ensuring maximum performance for all users and all laboratories . The HPLC system was interfaced to a triple quadrupole mass spectrometer API 3200 Q TRAP, equipped with ESI ion source.

The mass spectrometer is equipped with a pump for infusion added to conduct experiments under FIA (Flow Injection Analysis) . The system API 3200 Small Benchtop available, increases the power and performance of the Mass Spectrometry by the presence of the triple quadrupole . The operator can choose a higher resolution depending on the issues to be solved (eg . Fixing the resolution individually loaded 0.5-0.6 atomic mass unit, or amu (atomic mass unit) tuning with half the molecular weight; this can help in the search for double charge ions . The low resolution especially in Q3, often improves sensitivity in the MRM (multiple reaction monitoring) mode used for quantitative analysis. The above mentioned MRM is the application of SRM (Selected Reaction Monitoring) to the ions produced by one or more precursor ions.

In the system 3000 of DIONEX UHPLC ultimate separation was achieved using a column chromatographic analytical Phenomenex 2.6U Kinetex XB- C18 100 A (100 x 2.10 mm), preceded by a precolumn

Phenomenex STRATA -X CW 25 microns on line 20 Extraction, 2 mm. Starting from the chemical standards and the deuterated analogues (internal standard) at different concentrations of the analytes, analyzed solutions in mobile phase are prepared. Both in Loading (load guard), and in the chromatography.

We will start by adding to 1 ml of urine, 30 µL of methanol solutions previously described, the analytes, and 30 µL of the solutions of internal standards.

By the hydrolysis reaction it has been possible to detach the analyte from the compound The system in use MQ4 can determine the various elements up to concentrations of less than one part per billion or PPB (below one part for billion).

So the path of the Drug Screening Validation. was applied to the following analytes:

Amphetamines

methamphetamine

MDA

MDMA

EDDP

morphine

benzoylecgonine

codeine

Cocaine

methadone

THC COOH

LSD

Norbuprenorphine

The whole procedure on-line SPE UHPLC-MS/MS is applied to samples of each standard in previously hydrolyzed urine samples and to mix samples containing the analytes considered at different concentrations . The solid phase extraction (SPE) is an extraction for adsorption, a physical process between a solid phase and a liquid, wherein the solid phase has a greater affinity for the compound to be isolated, as regards the solvent in which the same compound is dissolved. The adsorbent C18 bound to non polar groups allows good absorption and good chromatographic separation by HPLC.

In our laboratory at the end of the path through API3200QT , the ions are reported as Extracted ion chromatogram (XIC) using MRM (Multiple Reaction Monitoring) , i.e. the application of the SRM (Selected Reaction Monitoring) ions produced by one or more precursor ions .

In a research analysis of data standard samples are used to build charts " dose / response " that represent the calibration curves or straight lines.

The results obtained have allowed us to determine the calibration curve: 10, 30 75, 150, 300 ng/ml, show good linearity (LOL). The Limit of Detection (LOD): 5 ng/ml. The limit of quantification (LOQ): 10 ng/ml. In conclusion, the innovative contribution in the field of Forensic Toxicology, allowed to obtain a calibration curve, suitable for the rapid execution of the confirm tests for clinical and forensic purposes.

RIASSUNTO

Il presente lavoro è sorto dall'esperienza e dagli studi di dottorato presso l'UOC di Tossicologia del Laboratorio Analisi Cliniche dell'Ospedale di Belcolle, ASL Viterbo.

In particolare si è messo a punto il metodo di validazione che si applica nella ricerca di molti analiti nel corso della frequente conferma su matrice urinaria attestante la presenza di tracce seppur minima degli stessi, come si usa fare appunto nello screening delle sostanze d'abuso.

La prima parte del lavoro descrive l'attività quotidiana di un Laboratorio di tossicologia forense nell'ambito della diagnostica medico-legale, dalle Normative in vigore alle Linee-guida e alle Norme ISO per la certificazione.

Si segue in buona sostanza l'iter cui è sottoposto il Campione Biologico: dalla sua scelta alla raccolta del medesimo e alla catena di custodia, garanzia della genuinità del procedimento da tutti i punti di vista.

Riguardo alle Analisi Chimico-Tossicologiche vere e proprie accenno alla scelta del tipo di analisi, distinguendo quelle di primo screening (metodi immunochimici) da quelle di conferma (gas-cromatografia e cromatografia liquida, accoppiata alla spettrometria di massa) che riguardano peculiarmente il presente lavoro. Fissato pertanto lo standard di riferimento e testata la sensibilità, viene individuato il *cut-off*, ovvero il procedimento di esclusione dei campioni che non contengono sostanze o loro metaboliti o che abbiano una concentrazione inferiore alla concentrazione soglia. Il confronto con lo standard di riferimento in rapporto diadico con i controlli di qualità contribuiscono alla Validazione del dato analitico che è sottoposto a Refertazione e trasmissione del dato. Il nucleo centrale dell'elaborato è dedicato nella fattispecie, all'accoppiamento o *ifenzione* della gas cromatografia e/o cromatografia liquida ad alta efficienza con la spettrometria di massa (GC/MS - HPLC/MS) che ha esteso notevolmente le applicazioni di entrambe le tecniche.

L'elevata sensibilità consente inoltre l'identificazione ed il dosaggio di tracce di composti altrimenti non identificabili in miscele molto complesse.

Tale limite di rivelazione (identificazione) è quindi la più bassa concentrazione che permette di valutare qualitativamente la presenza o assenza di un analita e viene indicato con il termine **LOD** (*Limit of Detection*) e deve essere stabilito in ogni laboratorio in riferimento alla strumentazione che viene utilizzata. Il limite di quantificazione (**LOQ** - *Limit of Quantitation*) è la più bassa concentrazione dell'analita che può essere calcolata con precisione e accuratezza prestabilite, generalmente considerando il segnale attribuito all'analita circa 10 volte superiore alla deviazione standard del bianco.

Tuttavia il Laboratorio non fornisce esclusivamente un risultato analitico, ma l'emissione del dato è condizionata da una serie di valutazioni chimico-tossicologiche che possono essere effettuate soltanto da chi ha esperienza e bagaglio culturale idoneo. Quello che viene richiesto al Tossicologo Forense è infatti l'interpretazione del dato analitico ottenuto; l'interpretazione riguarda il significato della positività o negatività in relazione ad una serie di parametri quali ad esempio la tipologia del campione biologico esaminato e le tecniche analitiche utilizzate. I cambiamenti nel panorama dell'abuso di sostanze stupefacenti rendono

necessari programmi di controllo e di collaborazione con altri laboratori al fine di aggiornare e ottimizzare continuamente le procedure analitiche.

Lo spettrometro di massa esalta il metodo di rivelazione pur mostrando un *iter* distruttivo. Esso può essere associato al cromatografo liquido per la ricerca di sostanze d'abuso. Il principio di funzionamento è abbastanza semplice: il campione viene introdotto in una camera dove viene ionizzato e frammentato. Questi frammenti carichi elettricamente vengono fatti migrare e la loro velocità di frazionamento sarà in base al rapporto peso molecolare/carica. I rivelatori, per trasduzione del segnale faranno il resto ottenendo gli spettrogrammi utilissimi per le conclusioni.

Nella seconda parte del dottorato si è posto in rilievo l'aspetto tecnico della strumentazione in dotazione.

Il campione viene introdotto in modo tale che all'interno della camera sia assicurato il vuoto. Questo viene frammentato e ionizzato dallo ionizzatore. Nel nostro caso si tratta di una ionizzazione ad impatto elettronico (ESI): un filamento incandescente di tungsteno, produce degli elettroni, che viaggiano verso un anodo posto dalla parte opposta. Questa accelerazione fa viaggiare gli elettroni ad una energia molto elevata (70 eV). Poiché per ionizzare una molecola basta in genere una energia di 13-14 eV, l'analita non viene solo ionizzato, ma anche frammentato.

I frammenti raggiungono infine l'analizzatore. Esaminiamo in verità tutti i metodi di ionizzazione e tutti i tipi di analizzatori diffusi nella pratica laboratoristica.

Esistono in altri termini, diversi tipi di analizzatori, ma nel nostro caso viene utilizzato per l'analisi un analizzatore a quadrupolo e ad esso si è dedicato maggiore approfondimento riguardo alla struttura e alla funzione. Questo è costituito da quattro barre metalliche al molibdeno che delimitano il cammino percorso dagli ioni nel tragitto tra ionizzatore e rivelatore.

Durante questo tragitto, il potenziale elettromagnetico delle barre è mantenuto oscillante, ovvero se nell'istante T0 due barre sono positive e altre due sono negative, all'istante T1 quelle positive diventeranno negative e viceversa.

Agendo sulla frequenza di queste oscillazioni, i frammenti si muoveranno con un tragitto sinusoidale verso il rivelatore. Quindi tali frammenti si muoveranno ad una velocità in funzione della carica e del peso molecolare. Il segnale emesso dal fotomoltiplicatore (il rivelatore), viene elaborato mediante un computer il quale sarà in grado di utilizzare il segnale per tracciare lo spettro di massa.

Presso il nostro servizio di Tossicologia le analisi in **HPLC-ESI-MS/MS** sono effettuate attraverso un sistema **UHPLC UltiMate 3000 di DIONEX** con controllo remoto (via software di gestione strumentale o proprio comando manuale), equipaggiato di auto campionatore termostato e modulo per l'alloggiamento della colonna analitica egualmente termostato. Il sistema UltiMate 3000 HPLC offre la compatibilità UHPLC su tutti i moduli, assicurando massime prestazioni per tutti gli utenti e tutti i laboratori. **Il sistema HPLC è stato interfacciato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 3200 Q TRAP, fornito di sorgente ionica ESI.**

Lo spettrometro di massa è dotato di una pompa per infusione aggiunta per condurre esperimenti in regime di **FIA (Flow Injection Analysis)**. Il sistema **API 3200 Small Benchtop** a disposizione, aumenta il potere e il

rendimento della Spettrometria di Massa mediante la presenza del triplo quadrupolo. L'operatore può scegliere una risoluzione più alta in base ai problemi da risolvere (ad es. fissando la risoluzione singolarmente caricata a 0.5-0,6 **uma** o **amu** o atomic mass unit (unità di massa atomica) completamente sintonizzato con metà del peso molecolare, può aiutare nella ricerca di ioni a doppia carica. La bassa risoluzione specialmente in Q3 (triplo quadrupolo), spesso migliora la sensibilità nella **MRM (Multiple Reaction Monitoring)**, modalità usata per l'analisi quantitativa. La MRM è come ricordato, l'applicazione della SRM (*Selected Reaction Monitoring*) agli ioni prodotti da uno o più ioni precursori.

Nel sistema UHPLC *ultimate 3000* di DIONEX la separazione è stata ottenuta utilizzando una **colonna cromatografica** analitica Kinetex Phenomenex 2.6U XB- C18 100 A (100 x 2,10 mm), preceduta da una **precolonna** Phenomenex STRATA-X CW 25 micron on line Extraction 20, 2 mm.

Partendo dagli standard chimici e dagli analoghi deuterati (standard interni), a diversa concentrazione degli analiti in studio, si approntano delle soluzioni in **Fase Mobile**.

Sia nel *Loading* (caricamento della precolonna), che nella *cromatografia* in atto.

Iniziamo aggiungendo a 1 ml di urina 30 µL delle soluzioni metanoliche di partenza, precedentemente descritte, degli analiti, e 30 µL delle soluzioni di standard interni.

Mediante la reazione di **idrolisi** così descritta è stato possibile staccare l'analita dal composto.

Il sistema MQ4 in uso riesce a determinare i vari elementi fino a concentrazioni inferiori ad una parte per miliardo o PPB (*below one part for billion*).

Sicché il percorso del *Drug Screening Validation* è stato applicato ai seguenti analiti.

Amfetamine

Metamfetamine

MDA

MDMA

EDDP

Morfina

Benzoilecgonina

Codeina

Cocaina

Metadone

THC COOH

LSD

NORBUPRENORFINA

L'intera **procedura on line SPE UHPLC-MS/MS** viene applicata ai campioni dei singoli standard in urina precedentemente idrolizzati e a campioni di mix contenenti gli analiti considerati a diverse concentrazioni.

L'estrazione in fase solida (SPE) 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. L'adsorbente C18(colonna cromatografica) legato a gruppi non polari permette un buon assorbimento e una buona separazione cromatografica dell'HPLC.

Nel nostro laboratorio al termine del percorso attraverso API3200QT, gli ioni vengono segnalati come *Extracted ion chromatogram* (XIC) tramite la **MRM (*Multiple Reaction Monitoring*)**, cioè l'applicazione della SRM (*Selected Reaction Monitoring*) agli ioni prodotti da uno o più ioni precursori.

In una ricerca analitica di dati si usano campioni standard per costruire dei grafici "dose/risposta" che rappresentano delle **rette o curve di calibrazione**. I risultati ottenuti hanno permesso di determinare i punti della curva: 10, 30 75, 150, 300 ng/ml dimostrano una buona linearità (LOL).

Il limite di rivelabilità (LOD): 5 ng/ml. Il limite di quantificazione (LOQ) : 10 ng/ml. In conclusione, il contributo innovativo nell'ambito della Tossicologia Forense, è stato quello di riuscire ad ottenere una curva di calibrazione, idonea alla rapida esecuzione dei test di conferma ai fini clinico-forensi.

PREMESSA

Il presente lavoro è il risultato dell'esperienza maturata presso il nostro servizio nel penetrare in questo argomento laboratoristico. La convalida del metodo bioanalitico include tutte le procedure attestanti che un particolare metodo utilizzato per la misurazione quantitativa di analiti in una data matrice biologica, come sangue, plasma, siero o urina, sia affidabile e riproducibile per l'uso previsto. In questo caso sono stati trattati campioni di urina. Il *reporting* di questo lavoro, si presenta come contributo clinico-forense, presso l'U.O. di Tossicologia del Servizio di Laboratorio Analisi Cliniche dell'Ospedale di Viterbo, ASL VT

In Appendice, ho aggiunto la mia traduzione della "Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation" U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001 BP.

1. INTRODUZIONE

Oggi, nuove forme di intossicazione legate alle tossicodipendenze affliggono soprattutto l'occidente cosiddetto opulento, ma finiscono per coinvolgere l'intera comunità degli Stati, e impongono alla società un alto livello di sorveglianza, allo scopo di porvi rimedio con un tempestivo intervento, almeno nel caso ove ciò si renda possibile.

La possibilità di validare la presenza di tracce delle citate sostanze, assunte come droghe con l'illusione di rendere più sopportabile l'esistenza, viene a contribuire allo scopo di un giovevole e insostituibile esercizio di una medicina legale e di salvaguardia della pubblica salute. A proposito della morfina, il primo oppioide riconosciuto, vorrei rammentare che Friedrich Sertürner era un giovane farmacista tedesco che fin dal 1805 aveva scoperto tale capostipite degli oppiacei e l'aveva dapprima chiamato *morphium* per ricordare il dio del sonno, Morfeo. Gli oppiacei funzionano occupando i recettori oppioidi del dolore nelle cellule neuronali del talamo e del sistema limbico, impedendo la trasmissione nocicettiva da parte degli stimoli e dei mediatori chimici del dolore provenienti dalla periferia.

Omero parla già dell'uso del <nepente> (*nepenthes distillatoria*) pianta insettivora tropicale con foglie che secernono un liquido zuccherino, a base di oppio; esso veniva adoperato dai guerrieri greci in battaglia. Ma la coltivazione del papavero era praticata circa 4000 anni a.C., nel Medio Oriente e sulle coste del Mediterraneo. La <pianta della gioia> ovvero lo stesso papavero, era conosciuta fin dalla preistoria.

Galeno ne raccomanda l'uso con queste parole: “*perché esso combatte i veleni e i morsi velenosi, cura il mal di testa, le vertigini, la sordità, l'epilessia, l'abbassamento di vista, la perdita della voce, l'asma, la tosse, gli espettorati sanguigni, la mancanza di respiro, le coliche, l'itterizia, l'indurimento della milza, i calcoli, i disturbi urinari, la febbre, l'idropisia, la lebbra, le malattie delle donne, la melanconia e tutti i generi di pestilenza*”.

Se ne conobbero le proprietà antalgiche ed anestetiche da circa 2300 anni a.C.

Il papavero da oppio, accompagnò la diffusione dell'Islam in India, e gli Arabi, lo esportarono fino in Cina, nel IX secolo d.C.

Gli indigeni andini, usavano come stimolante e come anestetico, la foglia di coca, che contiene la cocaina. La morfina fu dunque prodotta in Germania nel 1805, e nel 1898 l'alcaloide sintetico eroina venne ottenuta mescolando la morfina con l'acido acetico. Questa eroina dava l'assuefazione più grave che si conoscesse e d'altronde non esisteva al tempo alcuna legislazione che regolamentasse l'uso di dette sostanze.

Solo nel 1906, un editto imperiale cinese vietò la coltivazione del papavero da oppio e solo nel 1914, il Congresso degli Stati Uniti approvò la legge Harrison sui narcotici. Gli effetti deleteri per la salute psicofisica dei giovani e per la sua ricaduta sociale, devastò fin da allora le società più progredite, in seno alle quali, alcune frange della classe media giunsero a permettersi l'acquisto delle sostanze stupefacenti. L'alcool e il tabacco non bastavano più a combattere il *taedium vitae*.

“BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION”

Applicazione di un metodo di validazione per l'analisi di droghe d'abuso su matrice urinaria

Questo mio percorso di dottorato prevede lo sviluppo di un metodo analitico selettivo e sensibile per la valutazione quantitativa di droghe d'abuso, fondamentale per la robustezza del risultato di analisi di Tossicologia Forense mediante l'utilizzo di un LC/MS/MS (Cromatografo liquido accoppiato a spettrometro di Massa tandem). La convalida del metodo bioanalitico include tutte le procedure attestanti che un particolare metodo utilizzato per la misurazione quantitativa di analiti in una data matrice biologica, come sangue, plasma, siero o urina, sia affidabile e riproducibile per l'uso previsto. I parametri fondamentali per la convalida comprendono accuratezza, precisione, selettività, sensibilità, riproducibilità e stabilità. Le sostanze d'abuso considerate, per le quali ci interessa studiarne e definirne l'analisi quantitativa e l'interpretazione degli spettri di massa sono:

ANFETAMINA

6-MONO-ACETILMORFINA

MORFINA

BENZOILECGONINA

BUPRENORFINA

COCAINA

THC

THCCOOH

CODEINA

METADONE

1.1 Il Laboratorio di tossicologia forense nell'ambito della diagnostica medico-legale

La **Tossicologia Forense** è una disciplina nata all'interno degli Istituti di Medicina Legale per la diagnosi di avvelenamento (Lodi F., Marozzi E. 1982; Bertol E., Mari F., Marozzi E. 1994) ma nel corso degli anni ha sviluppato numerose diramazioni in diversi campi di interesse, soprattutto a causa della diffusione dell'uso/abuso di sostanze stupefacenti. Oggi tale disciplina ha per oggetto la totalità delle questioni di carattere tossicologico attinenti l'ambito forense, e quindi al laboratorio possono essere richieste informazioni di vario tipo che vanno dalla determinazione di un eventuale stato di tossicodipendenza alla verifica di uso/mis-uso di sostanze psicotrope sia per finalità amministrative che legali (Ferrara S.D. 1989).

Attualmente i campi di interesse della Tossicologia Forense includono anche i controlli del personale a rischio nei luoghi di lavoro (Chiarotti M., De Giovanni N., Fucci N., Danese D. 1999; Cone E.J. 2001; Verstraete A.G., Pierce A. 2001), il controllo del contratto terapeutico nei programmi di riabilitazione (Scarlata S., Chiarotti M., Fucci N., De Giovanni N. 2001; Guerrini F., Ceppellini C., Resentini M. 2002), gli accertamenti di tipo assicurativo, i controlli nell'ambito della sicurezza stradale nonché l'accertamento di doping (Ferrara S.D. 2004).

Il Laboratorio di Tossicologia Forense è un laboratorio di chimica analitica ad elevata specializzazione al quale viene richiesta affidabilità e garanzia della qualità della prestazione erogata. A tale scopo deve utilizzare sofisticata strumentazione e risorse umane qualificate, addestrate ed aggiornate che abbiano competenze specifiche nella diagnostica chimico-tossicologica.

Scopo del presente lavoro è quello di illustrare l'organizzazione del Laboratorio di Tossicologia Forense, esaminando i vari aspetti coinvolti nella strutturazione del processo analitico che va dalla fase preliminare di scelta del campione biologico e della metodologia adeguate al tipo di indagine richiesta, fino alla produzione del dato analitico e relativa interpretazione.

Il Laboratorio di tossicologia forense in qualità

Il Laboratorio di Tossicologia Forense deve regolamentare la propria attività nell'osservanza di diverse normative che costituiscono requisito cogente; è inoltre auspicabile che vengano osservate le procedure indicate nelle linee-guida dalle diverse associazioni scientifiche accreditate sia nazionali che internazionali (Zuccaro P., Pichini S., Altieri I., Pacifici P. 1996).

L'obiettivo di un laboratorio che lavora in qualità è costituito non solo dall'affidabilità dei risultati analitici, ma anche dalla possibilità di dare evidenza all'attendibilità dei processi e procedure utilizzati per ogni analisi effettuata.

E' quindi necessario introdurre degli strumenti che siano in grado di controllare processi e procedure ed allo stesso tempo di rintracciare e registrare ogni fase del procedimento svolto. A tale scopo può essere quindi

importante l'adozione di un sistema di qualità che grazie all'inserimento di metodologie e procedure codificate fornisca una guida alla gestione del sistema.

1.1.1 Normative

La prima normativa cui deve far riferimento un Laboratorio di Tossicologia è senza dubbio quella contenuta nel Testo Unico delle leggi in materia di stupefacenti (D.P.R. 9 ottobre 1990, n. 309 e successive modifiche), che abbiamo apposto all'inizio.

Esso ha unificato e in parte modificato le leggi precedenti con i decreti applicativi emanati dal Ministero della Salute, nell'intento di allinearsi con le più recenti risoluzioni adottate dagli Stati membri della Comunità Europea. Gli obiettivi dichiarati dal D.P.R. 309/90 sono fondamentalmente di combattere nel modo più efficace possibile la diffusione di tutte le sostanze stupefacenti e creare sanzioni amministrative e penali in ordine di gravità crescente. Stabilisce inoltre che le sostanze stupefacenti o psicotrope, sottoposte alla vigilanza ed al controllo del Ministero della Salute, siano raggruppate in sei Tabelle, sottoposte a continuo aggiornamento.

Lo scorso febbraio è stata pubblicata la Legge n. 49/2006 contenente modifiche al D.P.R. 309/90 riguardanti anche la suddivisione in tabelle delle sostanze sottoposte a vigilanza. Attualmente la normativa ha raggruppato le sostanze stupefacenti in due sole tabelle. La stessa normativa regola i requisiti soggettivi per l'autorizzazione all'acquisto, alla custodia ed al corretto impiego di standard di sostanze stupefacenti da utilizzare nel Laboratorio di Tossicologia Forense per tutte le fasi analitiche.

La diffusione dell'abuso di sostanze stupefacenti e/o psicotrope nella popolazione pone problemi non solo di natura forense, ma genera anche oneri di carattere amministrativo che non sono certamente meno preoccupanti.

Tra questi si inserisce l'articolo 125 del DPR 309/90 che prevede che gli appartenenti alle categorie di lavoratori destinati a mansioni che comportano rischi per la sicurezza, la incolumità e la salute di terzi (individuati con decreto del Ministero del Lavoro e della Previdenza Sociale, di concerto con il Ministero della Salute) siano sottoposti ad accertamento di assenza di tossicodipendenza prima dell'assunzione in servizio e, successivamente, ad accertamenti periodici (Chiarotti M., De Giovanni N., Fucci N., Danese D. 1999; Cone EJ. 2001).

In tale contesto il tossicologo è chiamato a verificare l'uso/abuso di sostanze stupefacenti attraverso una serie di accertamenti.

In tema di sicurezza stradale, gli articoli 186 e 187 del vigente Codice della Strada (D.L.n.285 del 30-04-92 e aggiornamenti successivi) prevedono accertamenti tossicologici su conducenti di veicoli coinvolti in incidenti stradali o quando si abbia motivo di ritenere che il conducente del veicolo si trovi in stato di alterazione psicofisica derivante dall'influenza dell'alcool, o sotto l'effetto conseguente all'uso di sostanze stupefacenti o psicotrope (Borriello R., Chiarotti M., Lodi F. 2005).

Le disposizioni contenute nel Decreto Legislativo n.196 del 30 giugno 2003, in materia di protezione dei dati personali, con particolare riguardo alla gestione delle risorse umane (Direttiva n. 1/2005) trovano una applicazione in ambito tossicologico-forense, in quanto vengono trattati dati sensibili in contesti particolarmente delicati. Infatti il laboratorio non è autorizzato ad effettuare analisi su materiale biologico prelevato da altre persone senza il consenso dell'interessato e la garanzia della catena di custodia; non è possibile inoltre consegnare i referti analitici a terze persone né comunicare i risultati telefonicamente.

Altra normativa cui fare riferimento è il Decreto Legislativo n.626 del 19 settembre 1994 che recepisce in Italia le direttive della CEE finalizzate a promuovere la salute e la sicurezza dei lavoratori nei luoghi di lavoro. Nell'osservanza di tali direttive il Laboratorio di Tossicologia Forense deve stabilire delle regole da seguire per tutelare e garantire la sicurezza del personale afferente.

Negli ultimi anni i Laboratori di Tossicologia Forense sono stati chiamati ad affiancare i centri di ricerca antidoping nell'ambito della prevenzione e tutela della salute in ambiente sportivo (Ferrara S.D. 2004). In tale ottica il laboratorio deve seguire le direttive riportate nella legge n. 376 del 14 dicembre 2000 recante *“Disciplina della tutela sanitaria delle attività sportive e della lotta contro il doping”*. Questa Legge contiene disposizioni di particolare rilevanza, anche di carattere penale, per tutti coloro che utilizzano sostanze illecite durante le attività sportive o che ne siano coinvolti a livello organizzativo

Linee-guida - Norme ISO per la certificazione

Gli accertamenti tossicologici in tema di analisi di sostanze d'abuso nei reperti biologici, possono assumere carattere di prova giudiziaria, pertanto è necessario non solo migliorare la qualità analitica, ma uniformare le procedure analitiche ed organizzative del laboratorio. E' auspicabile quindi che un Laboratorio di Tossicologia Forense si attenga ai principi riportati nelle linee guida indicate da Società Scientifiche Nazionali ed Internazionali al fine di rispettare requisiti che garantiscano la sicurezza di qualità. Tali requisiti riguardano il personale afferente al laboratorio, la struttura, la procedura di acquisizione dei campioni, l'analisi e l'interpretazione dei risultati, il monitoraggio interno ed esterno dell'affidabilità analitica, le modalità di refertazione.

A livello Nazionale da svariati anni il **Gruppo dei Tossicologi Forensi (G.T.F.I)** della S.I.M.L.A.) si sta occupando della elaborazione di linee guida specifiche per la disciplina. Tali direttive hanno lo scopo di fornire utili suggerimenti e regole agli operatori in modo tale che i risultati analitici siano accettabili in ambito medico legale. Già nel novembre del 1998 fu affidato ad un gruppo di lavoro il mandato di elaborare delle proposte in tema di *“Qualità Totale”* che sono state sottoposte a successive modifiche e approvate dal G.T.F.I. L'esigenza di far riferimento a linee guida specifiche, nasceva dalla consapevolezza che a garanzia della qualità delle prestazioni tossicologiche non fosse più sufficiente l'esperienza di singoli operatori ma che occorresse individuare criteri e procedure comuni utilizzabili per una valutazione oggettiva delle prestazioni

erogate dal laboratorio. La verifica del consenso venne effettuata in occasione di raduni scientifici nazionali (Chiarotti M., Borriello R., Gigli F., Poletti A. 2000) e la prima stesura delle linee guida è stata pubblicata nel 2002 (Borriello R., Caligara M., Chiarotti M., Ferrara S.D., Gagliano Candela R. 2002) ed in modo completo nel 2003.

L'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO) si è premurata di fornire delle Linee Guida per stabilire i requisiti indispensabili per i laboratori e per procedere alla valutazione di questi requisiti al fine di darne valore legale.

L'adozione di una politica di verifica della qualità, intesa come eccellenza del risultato ed efficienza organizzativa (il costante miglioramento dello standard di qualità del servizio fornito, la responsabilizzazione di tutto il personale, la diffusione della Politica di Qualità) dovrebbe essere perseguita come un obiettivo primario del Laboratorio. A tal fine è necessario adottare delle procedure che regolino le attività principali, l'adeguatezza e la corretta esecuzione di tali attività, nonché la misurazione dell'efficienza del sistema qualità. Il laboratorio deve raccogliere in un manuale le Procedure Operative Standard (SOP o POS) che devono essere complete, aggiornate e disponibili a tutto il personale.

Tutte le procedure che riguardano le varie fasi del processo devono essere raccolte in forma documentale a partire dalla fase di accettazione delle richieste di analisi fino alla consegna del referto analitico.

1.1.2 Il Campione Biologico

Scelta del campione

La scelta del campione biologico da esaminare nelle analisi chimico tossicologiche è essenziale per poter ottenere una risposta adeguata in relazione alla finalità diagnostica con valenza medico-legale.

L'accertamento della eventuale presenza di sostanze stupefacenti sul materiale biologico può essere effettuato su diversi distretti corporei, differenti a seconda che si tratti di indagini su cadavere (Flanagan R.J., Connally G. 2005) o su soggetti viventi e in relazione alla finalità dell'analisi. Nel caso di accertamenti su vivente, vengono principalmente utilizzati campioni di urine, sangue, capelli, saliva e sudore; quando le analisi devono essere eseguite su materiale cadaverico, oltre ad urine, sangue e capelli si possono esaminare anche campioni di umor vitreo, bile, fluido cerebrospinale, frammenti di organi ecc. La differenza tra i campioni biologici consiste soprattutto nella finestra temporale in cui la droga può essere determinata, con intervalli di tempo che variano da poche ore per il sangue (Verstraete A.G. 2004), due-tre giorni per le urine (Vandevenne M., Vandebussche H., Verstraete A. 2000), alcuni mesi per le matrici cheratiniche. Altre differenze da considerare riguardano la invasività del prelievo, i costi delle analisi, la validità e riproducibilità dei risultati, la possibilità di interferenze, le difficoltà analitiche.

Le **matrici biologiche tradizionalmente utilizzate** in ambito forense sono le urine ed il sangue. Il campione di **sangue** può essere utilizzato per la determinazione di una eventuale assunzione recente di droghe, mentre il campione di urine è idoneo per verificare assunzioni pregresse.

Il campione di sangue infatti è l'unica matrice tradizionale in grado di fornire informazioni sullo stato di intossicazione in atto al momento del prelievo in quanto la finestra temporale risulta di poche ore. Il prelievo di tale fluido biologico comporta però una serie di svantaggi quali ad esempio l'invasività e la possibilità di rischio biologico da parte dell'operatore. Di contro è spesso indispensabile l'uso del sangue per ottenere informazioni relative ad un soggetto nel momento in cui si verifica l'evento come ad esempio in caso di incidente stradale (Moeller MR., Kraemer T. 2002). Tale fluido biologico risulta a tutt'oggi campione di elezione in quanto è ben noto il metabolismo per numerose sostanze tossiche (Hardman JG., Limbird LE., Molinoff PB., Ruddon RW., Goodman Gilman A. 1997).

Il campione biologico più usato per l'analisi delle droghe d'abuso e i loro metaboliti è certamente il campione di **urine** la cui finestra temporale è superiore al sangue (24 - 48 ore o più a seconda della sostanza) e può risultare utile sia nelle analisi di screening che in situazioni in cui sia necessario il controllo di eventuale assunzione di sostanze psicotrope. Questo campione biologico offre vantaggi sia per quanto riguarda i volumi disponibili (sufficienti sia per le analisi di conferma che per eventuale ripetizione delle analisi), sia per le concentrazioni più elevate della sostanza-parente e dei metaboliti rispetto ad altri fluidi; da considerare però la facilità di eventuale adulterazione, l'invasività del prelievo qualora si renda necessario un controllo a vista (sempre per finalità medico-legali), la mancanza di correlazione con la dose assunta.

Gli stessi campioni biologici vengono impiegati anche nelle indagini tossicologiche su cadavere, anche se i problemi analitici sono maggiori in quanto correlati ai processi post-mortem che rendono l'analisi più difficile con ripercussioni sull'interpretazione del dato (Flanagan RJ., Connally G. 2005).

Negli ultimi anni è stato introdotto l'utilizzo di **matrici biologiche alternative**, quali saliva (Drummer OH. Review 2005 - Kadehjian L. 2005) e sudore (Dolan K., Rouen D., Kimber J. 2004 - Samyn N., De Boeck G., Verstraete AG. 2002) che possono fornire informazioni sullo stato di tossicodipendenza a breve e a medio termine.

La **saliva** fornisce indicazioni utili sullo stato del paziente al momento del prelievo e quindi la finestra temporale è di poche ore. Il prelievo offre indubbiamente una serie di vantaggi dal punto di vista operativo, primo fra tutti la scarsa invasività e la scarsa possibilità di adulterazione.

D'altro canto l'impiego di tale liquido biologico comporta alcuni svantaggi quali ad esempio la bassa concentrazione degli analiti e la sensibilità a variazioni di pH (Cone EJ. 1993), in taluni casi vi può essere una contaminazione in caso di assunzioni orali o inalatorie (Kintz P., Samyn N. 2002). Inoltre la scarsa quantità di campione che può essere raccolto richiede analisi di screening con elevata sensibilità (Fucci N., De Giovanni N., Chiarotti M. 2003) e non è possibile effettuare analisi di conferma con le metodiche tradizionali che necessitano di una maggiore quantità di campione biologico.

Attualmente l'analisi chimico tossicologica di questo fluido biologico non è impiegata di routine nei Laboratori di Tossicologia Forense poiché non ancora validato per l'impiego in ambito medico-legale. La

possibilità di utilizzare il **sudore** in ambito tossicologico, è di più recente sperimentazione, anche se in alcuni Paesi, viene già impiegato in regime carcerario per il controllo di assunzione pregressa di stupefacenti per la sua caratteristica finestra temporale più ampia rispetto al sangue (Samyn N., De Boeck G., Verstraete AG. 2002- Kidwell DA., Holland JC. 1998). E' in tal modo possibile evidenziare un assuntore occasionale tramite un prelievo non invasivo eseguibile con dei cerotti adattati allo scopo e posizionati sul braccio del paziente, che permettono la traspirazione facilitando la raccolta del fluido.

Ci sono due fattori limitanti per l'uso di queste matrici alternative: la quantità che si può raccogliere e le concentrazioni sono inferiori alle urine. Il volume del campione ottenibile risulta elemento critico soprattutto per l'applicazione forense perché è necessario poter conservare una parte di campione per ripetere il test in caso di una contestazione. Altro campione biologico oggi utilizzabile in ambito medico-legale è il campione di capelli: è infatti noto che le sostanze esogene assunte dall'organismo vengono incorporate nella **matrice cheratinica** (capelli e peli prelevati da altri distretti corporei) in modo irreversibile, seppure in concentrazioni molto basse ed in relazione alla quantità della droga assunta ed alla frequenza d'uso. (Villain M., Cirimele V., Kintz P 2004). Questo tipo di analisi è pertanto utile nel caso in cui ci siano assunzioni ripetute nel tempo per provare un uso/abuso a lungo termine e per fornire dati analitici che abbiano valenza in ambito medico legale come nel caso di affidamento o custodia minori, rilascio porto d'armi, idoneità alla guida ecc.

Sebbene ci siano difficoltà nell'interpretazione dei risultati, in particolare concernenti la possibilità di contaminazione esterna e l'uso di trattamenti cosmetici, la maggior parte dei problemi analitici sono stati oggi risolti e le Società Scientifiche preposte hanno pubblicato opinioni di consenso proponendo delle linee guida per tale tipo di accertamento (Maurer HH, 2002). La procedura di raccolta dei capelli deve essere standardizzata e il prelievo deve essere effettuato da operatori sanitari specializzati, il campione può essere conservato a temperatura ambiente, la determinazione analitica richiede particolari precauzioni legate alla complessità della matrice ed alle basse concentrazioni degli analiti.

Raccolta del campione e catena di custodia

Nelle indagini tossicologiche con valenza medico legale, è indispensabile avere certezza della identità del campione biologico e della sua rintracciabilità in tutte le fasi operative, dall'acquisizione fino allo smaltimento .

A tale scopo è necessario istituire una **“Catena di custodia”** che documenti con apposita modulistica tutte le fasi pre-analitiche, la manipolazione, lo stoccaggio, l'analisi e la refertazione.

In quest'ottica, l'organizzazione del laboratorio deve essere tale da garantire la corretta procedura, a partire da una regolamentazione dell'accesso al laboratorio,

che deve essere limitato al solo personale autorizzato. Per i laboratori che eseguono anche analisi tossicologiche su reperti non biologici, l'acquisizione, la manipolazione

e lo stoccaggio dei campioni biologici deve avvenire in ambienti separati, contenendo il potenziale rischio di contaminazione.

Il prelievo del campione deve essere preceduto da una fase di accettazione comprendente l'identificazione del soggetto, che firmerà un "Consenso Informato", la finalità dell'indagine e la tipologia dell'analisi. Al campione biologico, prelevato nel rispetto della privacy e con la garanzia dell'identità, viene assegnato un numero identificativo univoco cui fare riferimento in tutte le fasi successive.

Il Laboratorio in via preliminare deve suddividere il campione in aliquote, una delle quali deve essere conservata per un tempo prestabilito (non inferiore ad un anno) per essere utilizzata in caso di contestazione. La quantità del campione prelevato deve essere sufficiente sia per l'espletamento delle analisi in funzione della finalità dell'indagine, che per eventuale ripetizione dell'analisi stessa. Le modalità di conservazione del campione devono essere idonee perché lo stesso mantenga le caratteristiche organolettiche garantendo in tal modo l'inalterabilità delle sostanze eventualmente presenti nel campione.

Analisi Chimico-Tossicologiche

Scelta del tipo di analisi

Per la produzione di risultati affidabili sono indispensabili metodologie analitiche dotate di sensibilità, precisione e accuratezza. Tutte le metodiche analitiche utilizzate dal laboratorio devono essere validate nelle condizioni operative scelte, riportate nel manuale delle procedure operative che deve includere anche la preparazione degli standard, dei reagenti e del campione, la calibrazione degli strumenti ed i criteri di accettabilità definiti per la produzione dei dati.

Un Laboratorio di Tossicologia Forense deve essere in grado di effettuare sia analisi di screening che analisi di conferma, nonché scegliere la tipologia dell'indagine idonea per il tipo di accertamento richiesto. La scelta del metodo risulta molto ampia e dettata da considerazioni diverse: deve essere valutata tenendo conto dei costi, della quantità di lavoro prevista, del livello di sensibilità e affidabilità richieste, della esperienza del personale, dell'uso finale del dato prodotto. Generalmente l'analisi tossicologica si effettua con uno screening preliminare per differenziare e rilevare campioni positivi nel minor tempo possibile ed escludere i campioni che non contengono sostanze o loro metaboliti o che abbiano una concentrazione inferiore alla concentrazione soglia (**cut-off**). Successivamente nei campioni presunti positivi si può procedere all'analisi di conferma, per la verifica della positività riscontrata con lo screening. L'analisi di conferma, che si deve basare su principi chimico-fisici diversi dallo screening, deve quindi identificare i singoli analiti, avere una sensibilità maggiore del cut-off del test preliminare ed essere in grado di fornire un dato quantitativo.

Analisi di screening

I test preliminari (soprattutto determinazioni immunochimiche) vengono effettuati generalmente sulla matrice urinaria, tanto che la maggior parte dei kit in commercio sono progettati ed utilizzati per questo campione biologico; solo alcuni test immunochimici sono stati ideati per esaminare campioni di siero. Le tecniche immunochimiche sono generalmente utilizzate per lo screening di tossici organici non-volatili, in quanto dotate di caratteristiche di elevata sensibilità e rapidità d'analisi, non necessitando di pretrattamento del campione biologico.

Tali metodiche si basano sulla competizione nei confronti di un anticorpo specifico, tra la sostanza tossica da identificare e la stessa sostanza marcata in modo tale da poter essere riconosciuta e monitorizzata dal sistema analitico.

In funzione del tipo di marcatura avremo diversi tipi di metodi immunochimici, così ad esempio: **radio-immunoassay** se l'antigene è marcato con isotopi radioattivi, **enzyme-immunoassay** se l'antigene è marcato con enzimi, **fluorescent-immunoassay** se l'antigene è marcato con sostanze fluorescenti ecc.

Comune a tutti i sistemi immunochimici è l'elevata sensibilità nonché la notevole rapidità e semplicità di analisi. Queste metodiche consentono oggi uno screening rapido per numerose classi di sostanze di interesse tossicologico, si deve tuttavia tenere presente che la specificità di tali sistemi di analisi è fondamentalmente legata alla specificità dell'anticorpo utilizzato dal sistema stesso e che anche in caso di specificità nominalmente elevata (impiego di anticorpi monoclonali) è sempre possibile che la reazione antigene-anticorpo venga influenzata in modo incontrollabile da vari fattori, quali la presenza di sostanze cross-reagenti, il pH, la forza ionica, ecc. Pertanto i risultati positivi ottenuti con queste tecniche analitiche debbono essere confermati mediante l'impiego di metodi di analisi dotati di maggiore specificità.

Analisi di conferma.

I fondamenti di tossicologia forense indicano che l'identificazione mediante un test preliminare di sostanze tossiche necessita di conferma con una tecnica basata su principi chimico fisici diversi; il test di conferma deve essere più specifico e sensibile per l'analita target. La qualità dei risultati dipende dalla validità della procedura analitica alle cui caratteristiche di sensibilità, specificità e riproducibilità occorre riservare un'attenta selezione. Le linee guida raccomandano la spettrometria di massa come tecnica di conferma elettiva. Il suo accoppiamento con la gas cromatografia e/o la cromatografia liquida, tecniche separative ad elevata efficienza, la rende idonea per le suddette finalità analitiche (Watson Jt.1985). La spettrometria di massa è una tecnica analitica basata sullo studio dei frammenti ionici che si producono dall'impatto di un fascio di elettroni (ionizzazione per impatto elettronico) o molecole elettricamente cariche (ionizzazione chimica) con una molecola neutra. I frammenti ionici prodotti vengono poi separati ed analizzati secondo il loro rapporto massa/carica. Il grafico che riporta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del rapporto massa/carica costituisce lo spettro di massa, caratteristico per ogni sostanza. Tale analisi è in grado di offrire ottime informazioni strutturali sulla molecola oggetto d'indagine e di assicurare livelli elevatissimi di sensibilità, consentendo quindi notevoli applicazioni di tipo qualitativo e quantitativo.

L'accoppiamento o *ifenzione* della gas cromatografia e/o cromatografia liquida ad alta efficienza con la spettrometria di massa (GC/MS - HPLC/MS) ha esteso notevolmente le applicazioni di entrambe le tecniche. Questi metodi sono, infatti, altamente complementari in quanto all'efficacia separativa delle tecniche cromatografiche viene associato l'elevato potere di identificazione della spettrometria di massa. Questo tipo di analisi richiede l'uso di uno standard interno, aggiunto al campione prima di qualsiasi trattamento, per minimizzare sia gli errori manuali che quelli strumentali, consentendo quindi accurate determinazioni quantitative. Gli analoghi dei composti in esame, marcati con deuterio, mostrando lo stesso schema di frammentazione della molecola non marcata, possono agevolmente essere utilizzati come standard interni con elevata specificità.

Recentemente l'introduzione della tecnica LC/MS/MS (MacLafferty FW, 1981) ha reso possibile l'esecuzione di analisi di miscele complesse, anche quando la separazione cromatografica non risulta ottimale. Mediante

questa metodica, infatti, viene separata dalla miscela in esame la specie ionica corrispondente allo ione molecolare dell'analita da identificare, che viene quindi sottoposto ad un secondo procedimento di frammentazione di massa, in modo da escludere le interferenze da parte di molecole strutturalmente simili. L'elevata sensibilità consente inoltre l'identificazione ed il dosaggio di tracce di composti altrimenti non identificabili in miscele molto complesse.

Standard di riferimento

Per le analisi chimico tossicologiche vengono generalmente utilizzati standard di riferimento e relativi analoghi deuterati di sostanze stupefacenti che vengono acquistati da ditte specializzate previa autorizzazione concessa dal Ministero della Salute secondo la normativa vigente (DPR 309/90); l'autorizzazione ha una scadenza periodica che deve essere verificata. La movimentazione di tali sostanze deve essere documentata in un apposito registro custodito dal Laboratorio di Tossicologia e sottoposto a regolare controllo da parte della ASL competente. Tutte le sostanze standard e tutti i reagenti utilizzati per le analisi devono essere corredati da documentazione di certificazione di analisi che attesti la fonte, la data di preparazione, le concentrazioni, i parametri analitici di controllo, la scadenza e le informazioni sulla tossicità del prodotto. La stabilità e integrità degli standard di riferimento devono essere preservate durante lo stoccaggio, pertanto è compito del Laboratorio provvedere ad una idonea conservazione, e verificare periodicamente la eventuale degradazione alla luce, all'umidità o alle basse temperature. L'identità e il grado di purezza degli standard devono essere verificate con idonee procedure in condizioni strumentali ottimali al momento della prima manipolazione. Tutti gli standard e i reagenti devono essere correttamente identificati mediante etichettatura uniforme, per tutte le sostanze devono essere riportate data di acquisizione, preparazione, scadenza e il nome del preparatore. Un ulteriore importante aspetto per la sicurezza della qualità consiste nella preparazione ed analisi di campioni biologici contenenti concentrazioni note di droghe e metaboliti, esaminati ad ogni sessione analitica insieme al campione incognito. I campioni di controllo devono essere allestiti in modo da contenere concentrazioni di analiti prossime al limite di sensibilità del test, poco superiori e poco inferiori al valore di cut-off.

Sensibilità e cut-off

Si definisce sensibilità analitica il rapporto tra il segnale strumentale e la minima concentrazione distinguibile dallo stesso. Tale parametro è espresso dalla pendenza della retta di calibrazione ed è caratterizzato dal limite di rivelazione che è il più piccolo risultato che può essere distinto dal bianco con una probabilità stabilita.

Tale limite di rivelazione è quindi la più bassa concentrazione che permette di valutare qualitativamente la presenza o assenza di un analita e viene indicato con il termine **LOD** (*Limit of Detection*) e deve essere stabilito in ogni laboratorio in riferimento alla strumentazione che viene utilizzata. Il limite di quantificazione (**LOQ** - *Limit of Quantitation*) è la più bassa concentrazione dell'analita che può essere calcolata con precisione e accuratezza prestabilite, generalmente considerando il segnale attribuito all'analita circa 10 volte

superiore alla deviazione standard del bianco. Con il termine cut-off viene indicata la più bassa concentrazione dell'analita al di sopra della quale un campione è considerato positivo. Questo parametro deve essere scelto con valore superiore al LOQ e in riferimento a quanto comunemente accettato in ambito scientifico nazionale ed internazionale. Il valore del cut off deve quindi scaturire da una scelta concordata in funzione degli scopi prioritari e previsti nel programma. Linee guida nazionali ed internazionali suggeriscono valori di riferimento da considerare in relazione alle diverse sostanze e diverse matrici biologiche .

Controlli di qualità

Il “Controllo di Qualità” è da tempo considerato un obbligo imprescindibile in tutti i settori della produzione industriale, culturale, scientifica, sanitaria. L'essenziale obiettivo del Laboratorio deve quindi consistere nel perseguire il massimo dell'affidabilità. A tal fine i Laboratori devono promuovere dei controlli di qualità interni ed interlaboratorio ed ispirarsi alle linee guida fissate dalle più accreditate società e accademie scientifiche internazionali in tema di sicurezza di qualità.

I Laboratori di analisi tossicologiche con finalità medico-legale devono adottare un sistematico **controllo di qualità interno (CQI)**. In ciascun laboratorio deve operare un supervisore del CQI attuato mediante controlli noti (contenenti quantità note di standard), controlli ciechi (campioni con identità e composizione sconosciuta all'analista) e verifica di aderenza di processi analitici alle procedure operative standard del Laboratorio. I Laboratori devono inoltre partecipare a programmi di **controlli di qualità esterni (CQE)** per la verifica dell'affidabilità analitica e per migliorare il livello di prestazione del laboratorio. (Ferrara SD, Brusini G, Maietti S, Frison G, Castagna F, et al., 1999).

Validazione del dato analitico

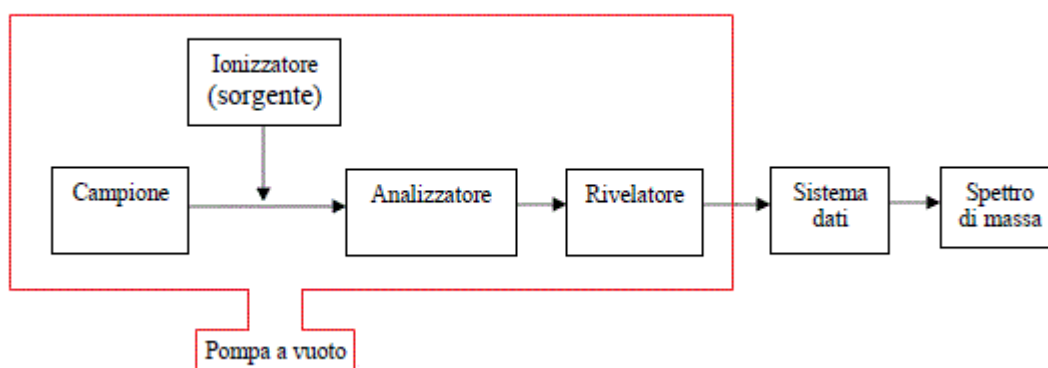
I risultati analitici ottenuti da un Laboratorio di Tossicologia Forense devono garantire un elevato grado di affidabilità considerando che si tratta di dati che possono avere una rilevante incidenza in ambito giuridico. E' necessario quindi stabilire delle regole di buona pratica di laboratorio tramite l'uso di procedure standardizzate e di metodologie validate. La validazione di un metodo analitico è un processo che permette di stabilire l'adeguatezza dei parametri di performance analitica; scopo della validazione è di provare l'affidabilità della procedura, documentare la competenza dell'analista, definire i limiti di controllo per la verifica dei parametri di qualità. La validazione di una metodica deve essere eseguita da ciascun laboratorio secondo procedure prestabilite ed i risultati devono essere descritti dettagliatamente nella documentazione. I parametri da considerare per la validazione del metodo includono il recupero dell'analita dalla matrice biologica, la sensibilità, la precisione, l'accuratezza, la specificità. Tutti questi parametri devono essere validati prima di introdurre una nuova metodica nella pratica del laboratorio (Colucci AP, Gagliano Candela R. 2004).

Refertazione e trasmissione del dato

Uno degli aspetti più delicati del processo analitico è sicuramente la refertazione, ossia la produzione di un rapporto analitico che deve contenere i risultati delle analisi effettuate dal Laboratorio. Il rapporto analitico finale deve essere prodotto esclusivamente in forma scritta, firmato da chi ha effettuato le analisi e dal Dirigente Responsabile del Laboratorio. Il referto può essere consegnato solo alla persona che ha fatto richiesta dell'accertamento o da una persona da lui delegata con delega scritta e copia del documento di identità del delegante. Il risultato delle analisi non può essere comunicato telefonicamente o tramite fax, può essere inviato per posta nel caso in cui ne venga fatta esplicita richiesta al momento dell'accettazione del campione. Quando il committente è un Ente o una struttura ospedaliera, verrà concordata con il Laboratorio la modalità di trasmissione del referto rispettando comunque la catena di custodia e garantendo la privacy. Nel referto devono essere indicati, oltre alla data e tutti gli estremi di identificazione del campione, anche il metodo impiegato per l'analisi, il cut-off e per le analisi quantitative il limite di sensibilità del metodo utilizzato oltre al valore numerico del risultato.

1.1.3 Lo spettrometro di massa : razionale per la ricerca in ifenazione

Lo spettrometro di massa è un metodo di rivelazione distruttivo che può essere associato al cromatografo liquido per la ricerca di sostanze d'abuso. Il principio di funzionamento è abbastanza semplice: il campione viene introdotto in una camera dove viene ionizzato e frammentato. Questi frammenti carichi elettricamente vengono fatti migrare e la loro velocità di frazionamento sarà in base al rapporto *peso molecolare/carica*. Un detector posto alla fine, rivela i frammenti ed è in grado, mediante il confronto con una banca dati esistente a priori, di riconoscere la sostanza, poiché ogni sostanza ha i propri frammenti (appunto, un proprio *spettro di massa*). Il punto di forza di questo metodo di rivelazione, è infatti esattamente questo: la capacità di saper riconoscere autonomamente quale sostanza sta rivelando, purché sia contenuta nella banca dati. Di seguito viene indicato uno schema funzionale dello spettrometro di massa.

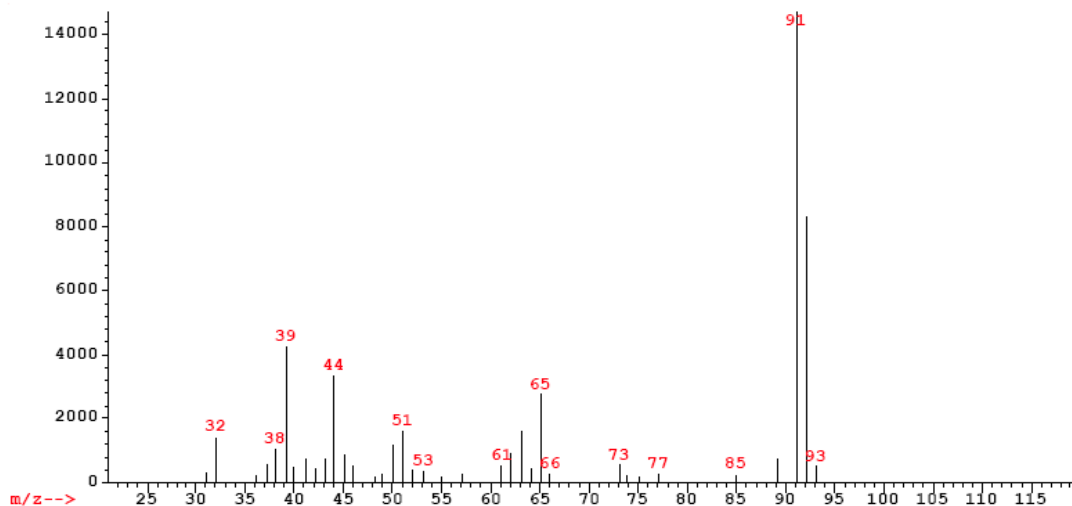


Il **campione** viene introdotto in modo tale che all'interno della camera sia assicurato il vuoto. Questo viene frammentato e ionizzato dallo **ionizzatore**. Nel nostro caso si tratta di una ionizzazione ad impatto elettronico (ESI): un filamento incandescente di tungsteno, produce degli elettroni, che viaggiano verso un anodo posto dalla parte opposta. Questa accelerazione fa viaggiare gli elettroni ad una energia molto elevata (70 eV). Poiché per ionizzare una molecola basta in genere una energia di 13-14 eV, l'analita non viene solo ionizzato, ma anche frammentato. I frammenti raggiungono l'**analizzatore**. Esistono diversi tipi di analizzatori, ma nel nostro caso viene utilizzato un analizzatore a quadrupolo. Questo è costituito da quattro barre metalliche che delimitano il cammino percorso dagli ioni nel tragitto tra ionizzatore e rivelatore. Durante questo tragitto, il potenziale elettromagnetico delle barre è mantenuto oscillante, ovvero se nell'istante T0 due barre sono positive e altre due sono negative, all'istante T1 quelle positive diventeranno negative e viceversa.

Agendo sulla frequenza di queste oscillazioni, i frammenti si muoveranno con un tragitto sinusoidale verso il rivelatore. Quindi tali frammenti si muoveranno ad una velocità in funzione della carica e del peso molecolare.

Il **rivelatore** è un fotomoltiplicatore: descritto semplicemente, questo è rappresentato da una serie di elettrodi, il primo dei quali, colpito dai frammenti, emette un segnale che colpisce l'elettrodo successivo, che a sua volta lo amplifica e lo invia a quello successivo ancora.

Il segnale emesso dal fotomoltiplicatore, viene elaborato mediante un computer il quale sarà in grado di utilizzare il segnale per tracciare lo spettro di massa.



Come viene utilizzata la spettrometria di massa per ifenazione con la tecnica di separazione in cromatografia liquida ?

(Dall'inglese *hyphenated* indica due tecniche i cui nomi vanno sempre legati con un trattino: es. GC-MS o LC-MS.

"The hyphen (-) is a punctuation mark used to join words and to separate syllables of a single word.

*The use of **hyphens** is called *hyphenation*". en.wikipedia.org/wiki/Hyphen.)*

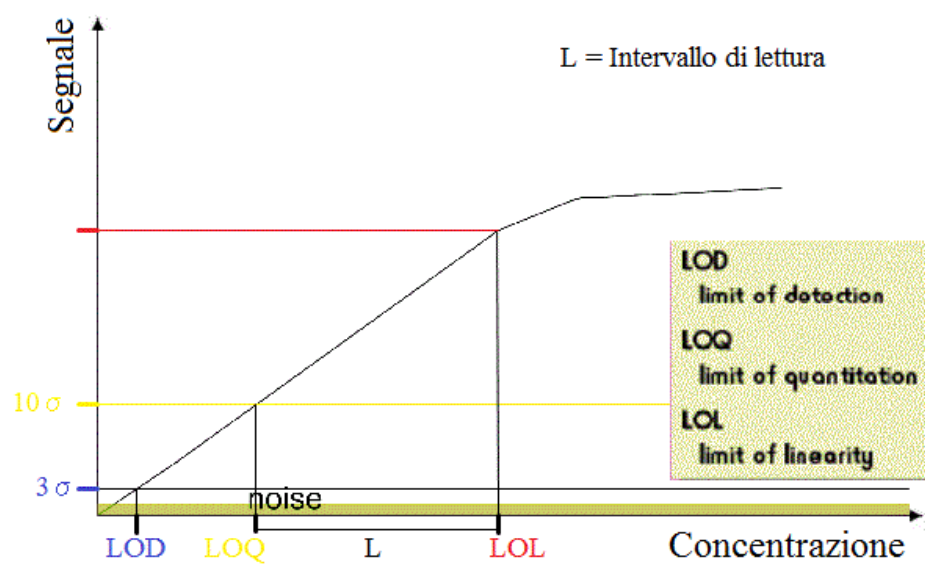
Lo spettrometro di massa costituisce un rivelatore particolarmente potente e versatile per tecniche di separazione quali la gas-cromatografia (GC), **la cromatografia liquida (LC)**, l'elettroforesi capillare (CE) e la cromatografia a fluido supercritico (SFC), grazie alla sensibilità molto elevata e la capacità di identificare i composti chimici. Per quanto riguarda il caso della cromatografia liquida. L'ostacolo principale da superare per accoppiare lo spettrometro di massa a un sistema di separazione come un cromatografo liquido è il mantenimento del vuoto nello spettrometro di massa mentre viene introdotto il flusso uscente dal cromatografo. Il solvente che eluisce da un cromatografo liquido, una volta vaporizzato, costituisce un volume 100-1.000 volte superiore a quello del gas di trasporto di un gas-cromatografo. Le interfacce maggiormente impiegate oggi giorno sono la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) e **la ionizzazione per elettronebulizzazione (*Electrospray Ionization*, ESI)**, precedentemente descritta. Nella LC-MS o per altre combinazioni tra tecniche di separazione e la spettrometria di massa i dati consistono in una serie di spettri di massa che vengono acquisiti in sequenza uno dopo l'altro. Per generare queste informazioni, lo spettrometro scandisce l'intervallo di massa selezionato (ad esempio 30-500 unità di massa) in maniera ripetitiva durante il corso della cromatografia. Se viene acquisito uno spettro per secondo, e la cromatografia dura 30 minuti, verranno registrati 1800 spettri.

Stato dell'arte:

Stiamo eseguendo “n” diluizioni degli analiti sopra citati per arrivare ad una curva di calibrazione con almeno 6 punti, che sia ripetibile e riproducibile, per definire i LOL (“*limito of linearity*”), LOD (“*limit of detection*”) e i LOQ (“*limit of quantitation*”) del metodo, rispettivamente. Il primo (“*limit of linearity*”) rappresenta il punto oltre il quale la relazione tra concentrazione e segnale non è più di tipo lineare; il secondo (“*limit of detection*”) che rappresenta il punto oltre cui la sostanza può essere rilevata, e l’ultimo (“*limit of quantitation*”) che rappresenta invece il punto oltre il quale lo strumento è in grado di quantificare l’analita.

Questo sugli standard. (Lo standard interno può essere una sostanza chimicamente analoga al campione in esame, o meglio ancora può essere la stessa molecola, ma ottenuta per sintesi sostituendo un isotopo di uno degli elementi presenti).

Poi si procederà su urine. Su matrice urinaria si aggiungeranno gli stessi analiti, ripetendo le calibrazioni, per arrivare a definire la curva, il recupero delle sostanze, sensibilità e specificità, precisione ed accuratezza del metodo.



NORMATIVA EUROPEA

La UE ha elaborato la strategia UE 2005-2012, per le droghe, e il piano di intervento (2009-2012), che include un capitolo concernente la collaborazione internazionale mirante alla necessità di approcci bilanciati tra gli Stati di fronte al problema.

(<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2008:326:0007:0025:it: PDF>)

Al presente comunque, ogni Stato Europeo applica sue proprie sanzioni legislative. Come esempio, in Italia l'uso della droga è escluso dal DPR 309/1990 che mostra con il commercio lecito, il trattamento e la prevenzione, nonché con la proibizione, la punizione delle attività illecite. (Decreto del Presidente della repubblica n. 309/1990. *Testo unico* delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, 1990)

Il numero delle droghe consumate è stabilmente in aumento e l'elenco delle droghe deve essere continuamente aggiornata (Guidelines of the laboratories of abuse drug analysis for forensic purposes, 2008).

Quando si dimostra con l'analisi la presenza di una droga nei fluidi biologici (urina, sangue, pelo e fluidi orali), si deve sottolineare che la maggioranza delle droghe è caratterizzata da un breve tempo di permanenza e ciò dipende anche dalla dose e dal tipo di assunzione, dal tipo di matrice e dal metabolismo individuale.

Nel corpo umano, le droghe sono generalmente metabolizzate a composti idrosolubili ed eliminate attraverso le urine.

Nondimeno la loro presenza può essere più tardi evidenziata con i composti derivati nel plasma, urina, sudore e peli. Ad esempio, l'eroina si trasforma in morfina and 6-monoacetilmorfina (6-MAM); la cocaina si trasforma in benzoil-ecgonine (BE) and ecgonina metil-estere (EME) (<http://www.iss.it/binary/ssps/cont/Tesi.pdf>); mentre il Δ^9 tetraidrocannabinolo (Cannabis THC) è metabolizzato a 11-nor-9-carbossi- Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC-COOH) e in 11-idrossi- Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC-OH).

on-site screening of drugs of abuse of United Nations International Drug Control Programme; Vienna Il THC da cannabis può essere ritrovato in plasma solo fino a 5 ore dall'assunzione e 10 ore nelle urine, mentre il metabolita THC-COOH raggiunge a volte una persistenza plasmatica fino a 20-57 ore nei fruitori occasionali e fino a 3-13 giorni nei consumatori abituali.

L'analisi delle droghe in campioni biologici è una ricerca di routine molto importante in campo clinico-medico e forense (Rapid, 2001). Generalmente, le droghe da abuso nei campioni biologici sono ricercate con un test di I livello, eseguito con tecniche immunochimiche (*enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA]*) o *radioimmunoassay (RIA)*, e/o *fluorimetric polarization immunoassay (FPIA)*.

I campioni positivi vengono ulteriormente confermati con un test di II livello caratterizzato più alta sensibilità per minimizzare il numero delle risposte falso-positive (EU drugs action plan 2009-12);. I valori cut-off dello screening nei campioni dell'urina non sono gli stessi per i vari paesi; per esempio, per quanto concerne gli oppiacei, la soglia di concentrazione è 300 ng mL⁻¹ in Europa (Council of European Union. EU drugs action plan (2009-2012); Brussels, 2008) e Australia and 2000 ng mL⁻¹ in the U.S.

Si richiedono metodi rapidi, accurati, precisi, e possibilmente con multicomponenti a buon mercato, per poter superare i tempi lunghi dell'analisi di screening e dei test di conferma.

1.2 Le tecniche Cromatografiche

Cromatografia

Nella cosiddetta ifenazione o accoppiamento, si coniuga un tipo di cromatografia con l'analisi durante la spettrometria di massa. Essa combina ad esempio la LC con la MS, e ancor più la HPLC -che è dotata di un grande potere di separazione- con il potere di rilevamento della spettrometria di massa. Descriviamo prima i vari tipi di Cromatografia per poi analizzare i vari settori dello spettrometro di massa.

La Cromatografia fu inventata dal botanico russo Mikhail Tswett ai primi del novecento facendo passare una soluzione di clorofilla e xantofilla attraverso una colonna di vetro impaccata con particelle di carbonato di calcio. Le bande colorate apparse lungo la colonna giustificano il nome. La cromatografia riesce a separare i componenti di una miscela in base alla velocità con cui vengono trasportati attraverso quella che è chiamata fase stazionaria, da una sostanza detta fase mobile, che è liquida o gassosa.

Con la Cromatografia si separano infatti i costituenti di un miscuglio omogeneo ripartiti tra *Fase Fissa o Stazionaria e Fase Mobile* .

E una prima classificazione si potrebbe porre in base alla natura della fase mobile.

- *Se la fase mobile è liquida* si annoverano le seguenti varietà di metodo: Liquido-liquido o di partizione; Liquido-fase legata, in cui delle specie organiche sono chimicamente legate ad una superficie solida; liquido-solido o di adsorbimento; a scambio ionico, cioè con una resina scambiatrice di ioni; e quella ad esclusione, in cui il liquido passa negli interstizi di un polimero solido.
- *Se la fase mobile è un gas*, si distingue tra i metodi quello Gas-liquido, in cui il liquido è adsorbito sul solido; Gas-fase legata, ancora con l'uso di specie organiche. Un terzo tipo di Gas-cromatografia si può realizzare con fluidi supercritici come fase mobile (SEC): è di tipo Gas-solido e la fase stazionaria può essere rappresentata da specie organiche. (Skoog D.A., West D. M, Holler F.J 1996)

Distinguiamo, per i principi fisico-chimici che determinano la ripartizione tra le due fasi, i sottotipi:

- Cromatografia di adsorbimento
- “ a scambio ionico
- “ per esclusione o gel-filtrazione
- “ di affinità
- “ di ripartizione: Fase Normale: *fase stazionaria polare, fase mobile meno polare*
Fase Inversa: *fase stazionaria non-polare, fase mobile polare*

Nella Cromatografia *a fase normale* i solventi più polari tra quelli in uso per la fase mobile, hanno, se confrontati, maggiore forza eluente.

Nella Cromatografia *a fase inversa* al contrario, quelli con maggior forza eluente sono i solventi meno polari.

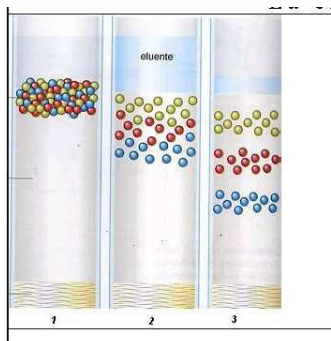
C'è sempre e comunque **una fase fissa o stazionaria, solida o liquida, ed una fase mobile che può essere liquida o gassosa.**

Un'altra distinzione si pone tra *cromatografia a colonna* e quella cosiddetta **planare**. La prima comprende la gas-cromatografia (GC), la cromatografia liquida (LC) con i vari sottotipi appena elencati. La cromatografia planare comprende a sua volta la TLC (*Thin Layer Chromatography*) o Cromatografia *a stato sottile*, che è una cromatografia a ripartizione; segue quella *su Carta*, pure intuitivamente planare, e quella per elettroforesi. (www.unibas.it)

Nella cromatografia **planare**, per aumentare la separazione tra gli analiti e quindi la loro identificazione è possibile effettuare l'eluizione lungo due dimensioni, prima lungo un asse e poi, girando a 90° la lastrina, lungo l'asse ortogonale, eventualmente con una fase mobile differente: in questo modo le macchie sono separate in maniera più efficiente .

La Cromatografia su carta

Questa tecnica viene utilizzata per separare piccole quantità di una miscela liquida depositata all'estremità di una striscia di carta. La striscia di carta viene immersa all'interno di un becher nel quale è stato inserito un solvente il cui livello deve essere inferiore rispetto al punto in cui è stata depositata la miscela.(<http://www.chimica-online.it/download/cromatografia-su-carta.htm>)



Dopo un intervallo di tempo variabile, il solvente, per capillarità, risale lungo il foglio di carta trascinando con sé, a velocità diversa, le sostanze solubili presenti nella miscela. (<http://www.chimica-online.it/download/cromatografia-su-carta.htm>)

La Cromatografia su colonna

Una miscela viene separata in base all'affinità dei diversi componenti verso una fase stazionaria immobilizzata in una colonna ed una fase mobile che fluisce in continuo attraverso di essa. Si basa cioè, sulla proprietà che hanno alcune sostanze, una volta sciolte in opportuni solventi, di fissarsi su materiali inerti (fase stazionaria) come ad esempio l'allumina, la silice, il talco o il carbonato di calcio. Prima verranno raccolti i componenti adsorbiti dalla fase fissa più debolmente e poi via via gli altri. (<http://www.laurea-online>)

In questo esempio: il componente azzurro ha maggiore affinità per la fase mobile e quindi esce per primo dalla colonna, quello giallo ha maggiore affinità per la fase stazionaria ed esce per ultimo, quello rosso ha comportamento intermedio.

(http://www.cedostar.it/documenti/corso_marcatori_sostanze_abuso_arezzo_test_cromatografici_correzzi.pdf)

Le **colonne** per HPLC sono in acciaio o in plastica, lunghe 5-30 cm e con diametro interno di 1-5 mm.

Le colonne sono costose e vengono facilmente danneggiate da polvere o da particelle o impurità presenti nel campione e nel solvente. È per questo che è necessario proteggere l'ingresso della colonna principale con una **pre-colonna** che contiene la stessa fase stazionaria della colonna principale, ma è più corta e può venire periodicamente sostituita. Essa protegge appunto la prima da eventuali impurità nel campione o nel solvente.

La **fase stazionaria** più comune è costituita da particelle microporose di silice ad elevata purezza, permeabili al solvente e con elevata area superficiale (alcune centinaia di m²/g). Questa fase stazionaria viene generalmente impiegata per cromatografia di adsorbimento. Più comunemente, si realizza la cromatografia di ripartizione impiegando **fasi stazionarie legate**, ossia fissate covalentemente alla superficie della silice.

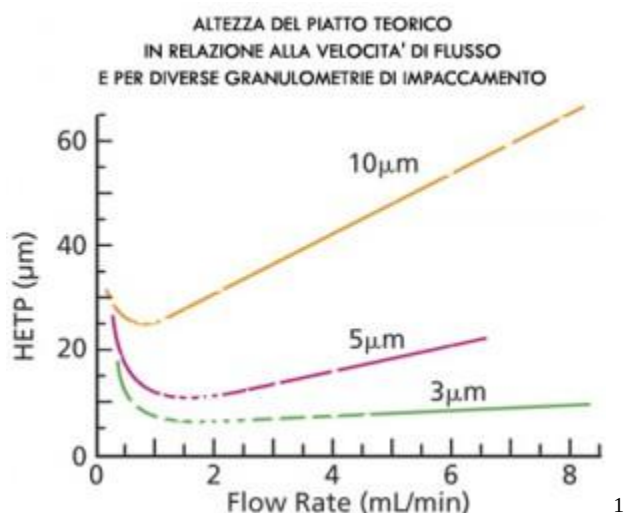
L'efficienza di una colonna cromatografica si misura solitamente calcolando l'altezza del piatto teorico H e il numero dei piatti teorici N .

Legando i due dati con la seguente relazione:

$$N = L/H,$$

in cui L è la lunghezza in cm della colonna. L'efficienza è tanto maggiore quanto più è piccolo H , e quanto più N è grande. L'altezza del piatto H è nota come **l'altezza equivalente di un piatto teorico (HETP)**. Più alto è il numero dei piatti teorici maggiore è l'efficienza; la quale però aumenta, se diminuisce l'altezza dei piatti stessi che possono raggiungere le centinaia di migliaia in quanto l'altezza di un piatto si misura con i decimi fino ai millesimi di centimetro.

Resta da spiegare perché si parli di "piatti teorici": Martin e Synge ipotizzarono che in una colonna cromatografica si stabilissero di continuo nuovi equilibri tra liquido e vapore come si stabiliva per la separazione dei idrocarburi nell'industria petrolifera; in quel caso però i piatti a campanella interconnessi esistevano davvero. Nella cromatografia il modello di questi piatti teorici spiega la forma gaussiana dei picchi cromatografici, ma non il tempo sufficiente per stabilire il nuovo equilibrio tra le due fasi. L'altezza H di un piatto teorico è definita come $H = \sigma^2 / L$, ove l'ampiezza di una curva gaussiana è descritta dalla deviazione standard σ , e dalla varianza σ^2 . (Skoog D.A., West D. M., Holler F.J.)



Nella “**Cromatografia Liquida (LC)**” la fase eluente è un liquido.

- Nella Liquido-Liquido (LLC) o di **ripartizione**, la fase stazionaria è un liquido, immiscibile con la fase mobile (es. acqua-etere), che impregna un supporto solido inerte; questo tipo di cromatografia è basato sulla diversa ripartizione di due o più soluti fra le due fasi liquide.

Le molecole del soluto si distribuiscono in altre parole tra acqua ed etere.

Come supporto alla fase stazionaria si usa per lo più la cellulosa.

La stessa **cromatografia** di ripartizione liquida, si può condurre **a fasi legate**, in cui la fase stazionaria è una specie organica legata chimicamente alla superficie delle particelle dell’impaccamento.

Estrazione Liquido-Liquido

La tecnica di estrazione liquido-liquido sfrutta il processo di **ripartizione** in base al quale un dato composto si distribuisce in funzione della propria solubilità tra due fasi non miscibili tra loro. Il coefficiente di ripartizione K, rappresentato dal rapporto tra la concentrazione dell’analita nella fase organica e in quella acquosa, può essere ottimizzato agendo su variabili del sistema, quali: solvente, pH, forza ionica e temperatura.

L’urina è una matrice acquosa, pertanto gli analiti vengono estratti mediante l’utilizzo di adeguati solventi organici, tenendo presente la *“regola” generale secondo cui “il simile scioglie il simile”, per cui sostanze apolari si estraggono meglio adoperando solventi apolari e viceversa.*

Il pH del campione può essere un valore critico per ottenere elevati recuperi di estrazione e deve di solito essere regolato in modo da favorire le forme indissociate dell’analita, maggiormente ripartibili nel solvente organico; l’aumento della forza ionica di una soluzione acquosa mediante l’aggiunta di tamponi salini sposta l’equilibrio di ripartizione delle sostanze lipofile a favore della fase organica.

Sia l’efficienza sia la selettività di un’ estrazione liquido-liquido migliorano attraverso estrazioni multiple con piccoli volumi di solvente di estrazione, in quanto l’utilizzo di due o più aliquote di solvente corrisponde a due o più procedimenti di estrazione e, quindi, si dimostra più efficace nel recupero, rispetto ad una singola estrazione con un’ aliquota di pari volume totale.

(http://www.fedoa.unina.it/1709/1/Castiglia_Ambiente_Prevenzione_e_Medicina_Pubblica.pdf.)

1.2.1 HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

“Il metodo strumentale della **cromatografia liquida ad alta pressione** (o **prestazione** agg.d.r.) è frutto dell’evoluzione tecnologica delle tecniche di cromatografia su colonna. [E’ ancora in sostanza, **una cromatografia liquida** agg.d.r.]. I principi sono sempre quelli dell’adsorbimento e della **ripartizione**, ma le fasi stazionarie sono impaccate in colonne chiuse, con materiali a granuli molto fini (5-10 µm) e controllati: in

tal modo viene aumentata la superficie di contatto fra fase mobile e fase stazionaria e l'impaccamento diviene più omogeneo. Le due tecniche che ad oggi sfruttano **il principio della ripartizione** sono la **gascromatografia e la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)**.

Il fenomeno della **ripartizione** viene sfruttato per la separazione in colonna degli analiti, che a seconda delle caratteristiche chimico fisiche si legheranno più o meno stabilmente alla fase stazionaria e quindi avranno diverso tempo di ritenzione. (http://it.wikipedia.org/wiki/Cromatografia_di_ripartizione)

Utilizzando queste colonne è necessario che la fase mobile venga fatta fluire ad alta pressione perché, attraverso colonne con tale impaccamento, il flusso dell'eluente diventa molto lento.

Con l'impiego di pompe particolari, capaci di applicare pressioni di 50-150 atm, diventa possibile ottenere flussi di alcuni ml/min, sufficienti ad ottenere l'eluizione in tempi ragionevolmente brevi."

(<http://www.uniurb.it/biotecnologie/didattica/docenti/documents/HPLC.pdf>, n. 6/45)

Colonne per HPLC (modificato) :

Fasi stazionarie,

Fasi polari comuni :

R=(CH₂)₃NH₂ ammino,

R = (CH₂)₃CNciano

Fasi non polari comuni:

R = (CH₂)₁₇CH₃ottadecile

R = (CH₂)₇CH₃ottile.

La C18 (ODS o Octadecilsilano) è la fase stazionaria di gran lunga più utilizzata in

HPLC.(http://www3.unipv.it/iscr/corso_itp/programmi_dispense/alberti/lez6a_%20cromatografia%20LC.ppt#282,7)

Nella **cromatografia di Esclusione** dimensionale (SEC [Size-exclusion chromatography]), la fase stazionaria è costituita da materiale poroso, avente i pori delle dimensioni delle molecole da separare (ad esempio setacci molecolari inorganici, tipo zeoliti, (<http://www.treccani.it/vocabolario/tag/zeolita/>)

oppure polimeri organici di porosità controllata). Il meccanismo di separazione è determinato esclusivamente dalle dimensioni dei soluti: le molecole più grandi si muovono velocemente lungo la fase stazionaria, mentre quelle più piccole sono più trattenute perché penetrano all'interno dei pori della fase stazionaria.

La **cromatografia di esclusione** si divide tuttavia in:

Cromatografia di esclusione dimensionale (SEC, **size-exclusion chromatography**) propriamente detta.

Cromatografia di filtrazione su gel (GFC, **gel filtration chromatography**) che utilizza la fase mobile acquosa.

Cromatografia a permeazione di gel (GPC, **gel permeation chromatography**), che utilizza una fase mobile organica. Sia la filtrazione su gel che la permeazione di gel, si ottengono solo se la fase fissa è un materiale rigido ([http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20\(metodi%20separazione-cromatografia.pdf\)](http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20(metodi%20separazione-cromatografia.pdf))).

Nella cromatografia a Scambio-Ionico (IEC[**Ion Exchange Chromatography**]), la fase stazionaria è costituita da una resina a scambio ionico, ossia un supporto organico al quale sono legati dei gruppi ionici o ionizzabili (ad esempio $-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$, $-\text{NR}_3^+$). I gruppi ionici della resina trattengono per mezzo di interazioni elettrostatiche, ioni di carica opposta che possono essere scambiati con gli ioni presenti nella fase mobile. Il meccanismo di separazione è basato perciò sulla diversa affinità che i diversi soluti (ionici) presentano nei confronti dei gruppi attivi della resina. *In altre parole si tratta di una cromatografia a fase normale in cui la fase fissa è polare e il solvente meno polare. In questa condizione di scambio ionico, confrontando i solventi, quelli tra loro più polari hanno maggiore forza eluente.*

Nella Liquido-Solido (LSC) o di **adsorbimento**, la fase stazionaria è un materiale solido costituito da particelle con grande area superficiale: in questo caso il solido non è un semplice supporto inerte, ma è in grado di adsorbire superficialmente i soluti da separare. Il meccanismo di separazione è quindi determinato dalla diversa affinità dei soluti per la fase solida. Come materiali solidi adsorbenti si usano generalmente gel di silice, allumina, carbone attivo. (<http://www.uniurb.it/biotecnologie/didattica/docenti/documents/HPLC.pdf>. n. 2/45.) Essi sono posti su strato sottile o su colonna, e in questa modalità agiscono forze del tipo van der Waals. *E' una cromatografia a fase inversa in cui la fase fissa è apolare, mentre il solvente è più polare. In questo caso, i solventi meno polari hanno maggiore forza eluente perché non interferiscono con le molecole del soluto.*

L'Eluizione è un processo nel quale i soluti vengono trasportati lungo una fase stazionaria dal flusso di una fase mobile. E l'eluente è pertanto un solvente usato per trasportare i componenti di una miscela attraverso la fase stazionaria. Si induce cioè, il percolamento di un soluto attraverso una colonna con l'aggiunta di un solvente puro. E' la differenza di velocità nella migrazione, in base all'affinità dei componenti per la fase mobile, che permette di separarli in bande ben visibili lungo la colonna. (Skoog D.A., West D. M, Holler F.J., 1996).

L'Eluizione, sia nello scambio ionico (IEC) che nella Liquido-Solido (LSC), può essere **isocratica** se si compie con un solo solvente o con una miscela di solventi di composizione costante. L'Eluizione sarà invece **a gradiente**, se c'è variazione continua del solvente per aumentare la forza eluente e migliorare la separazione. ([http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20\(metodi%20separazione-cromatografia.pdf\)](http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20(metodi%20separazione-cromatografia.pdf)))

La **elettro-cromatografia capillare** (CEC), è una tecnica simile da un lato alla elettroforesi su capillare, ma affine alla cromatografia liquida nel principio: all'interno del capillare è presente una fase stazionaria (che può essere legata chimicamente alle pareti interne del capillare), mentre la fase mobile è una soluzione acquosa tamponata che si muove per elettrosmosi (come avviene nella elettroforesi capillare).

(<http://www.sapere.it/enciclopedia/elettrocromatograf%C3%ACa.html>-)

Nella cosiddetta **Cromatografia per affinità**, la separazione si basa sulle proprietà biologiche delle molecole e non su quelle fisiche. La tecnica si basa sull'interazione delle molecole con determinati ligandi ancorati covalentemente con opportune matrici. Tali ligandi possono essere substrati specifici per enzimi, o antigeni per anticorpi, ecc.

1.2.2 Gas cromatografia

La **L.L.C.** (cromatografia liquido-liquido) e la **L.S.C.** (cromatografia solido-liquido) costituiscono due tecniche in grado di separare delle miscele contenenti sostanze solide o liquidi non volatili, sia su colonna che su strato. La gas cromatografia

(<http://www.unipa.it/~dctfpal/camardaanalisiIII/gascromatografia.doc>.)

si esegue al contrario, solo con tecniche a colonna e non con quelle planari.

Malgrado l'uso di un gas come fase mobile fosse la naturale estensione della cromatografia liquido-solido e liquido-liquido, la gas-cromatografia fu realizzata solamente nel 1941 dai premi Nobel Martin e Synge ([http://www.treccani.it/enciclopedia/la-grande-scienza-cronologia-scientifica-1941-1950_\(Storia-della-Scienza\)/](http://www.treccani.it/enciclopedia/la-grande-scienza-cronologia-scientifica-1941-1950_(Storia-della-Scienza)/)) e soltanto dopo dieci anni cominciò ad entrare nel comune uso di laboratorio.

Le caratteristiche che hanno fatto della gascromatografia una tecnica di larghissimo uso possono essere così riassunte:

- tempi di analisi molto ridotti
- possibilità di separare, operando nelle opportune condizioni, qualsiasi miscela di sostanze
- possibilità di effettuare analisi in serie, in quanto la stessa colonna può essere rigenerata di continuo dal gas di trasporto
- alta sensibilità (quantità di sostanza analizzabile 10^{-5} - 10^{-12} g)

Le analisi gas-cromatografiche sono applicabili soltanto a sostanze volatili o comunque rese tali con vaporizzazione e vengono realizzate con il gas cromatografo.

La **derivatizzazione** è il processo che permette di modificare chimicamente un composto per l'analisi GC. La derivatizzazione permette le seguenti modifiche:

- aumento della volatilità (elimina la presenza di gruppi polari come OH, SH, NH che disporrebbero ad interazioni con la fase stazionaria o altro)
- riduzione della volatilità (permette l'analisi di composti volatili a basso peso molecolare difficili da maneggiare e che sono eluiti con il solvente)
- aumenta la stabilità e la sensibilità (inserimento di gruppi alogenati per i rivelatori a cattura di elettroni o ECD[*electron capturedetector*]).

Le principali reazioni di derivatizzazione sono:

- Silanizzazione
- Alchilazione

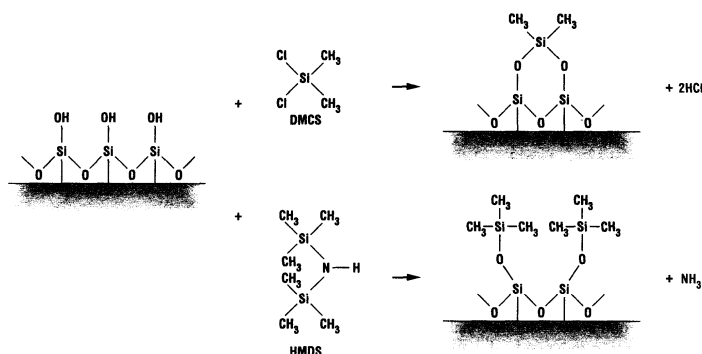
•acilazione (<http://www.skuola.net/materiale-universita/9797-gascromatografia.pdf>. diap. 21/26.)

Ricordiamo che in GC le molecole “viaggiano” in fase di vapore. I gruppi polari come -OH rendono le sostanze alto-bollenti. Per vaporizzare le molecole polari occorre un riscaldamento spinto che può provocarne la decomposizione termica. La derivatizzazione “maschera” i gruppi polari rendendo le molecole più volatili e quindi pronte per la GC

(http://www.cedostar.it/documenti/corso_marcatore_sostanze_abuso_arezzo_test_cromatografici_corezzi.)

Il materiale più usato per le fasi stazionarie liquide, è la *Terra di diatomee* (scheletri di piante unicellulari): materiale molto poroso con un buon grado di assorbività (fino al 30% del suo peso).

I numerosi gruppi idrossilici vengono rimossi per silanizzazione con dimetilclorosilano (DMCS) o



esametildisilazano (HMDS).

(Cfr. users.unimi.it/stefaniavilla/gas_cromatografia%20S.Villa%2016.1.08.ppt, diapositiva 16/62)

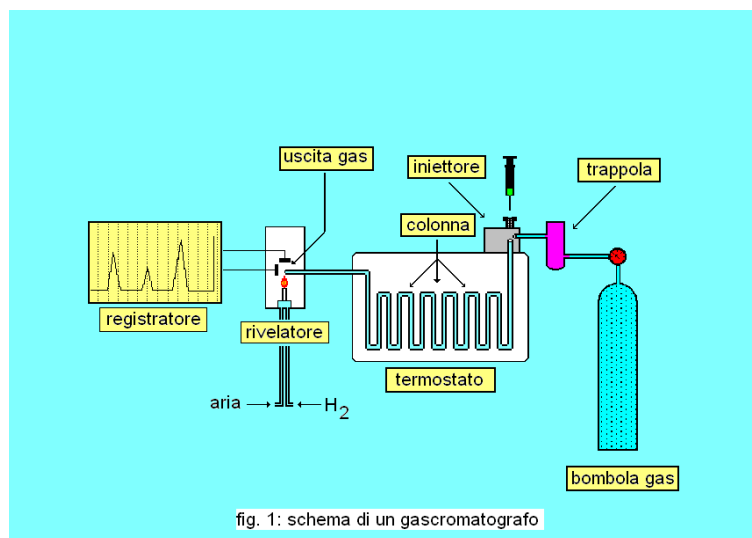


fig. 1: schema di un gascromatografo

Nella figura 1 viene riportato lo schema essenziale di un gascromatografo. La bombola contiene il gas che costituirà la fase mobile (**carrier**), questo viene purificato tramite alcune trappole prima di essere inserito in colonna.

La colonna cromatografica contenente la fase stazionaria –solido granulare o liquido su un supporto di particelle inerti- è posta all'interno di una camera opportunamente termostata allo scopo di tenere in fase gassosa i vari costituenti della miscela da separare. Questa, introdotta con un iniettore nella colonna, può

essere in fase gassosa, se la miscela è un gas, oppure solubilizzata in un opportuno solvente se la miscela da analizzare è liquida o solida.

La fase mobile è un gas permanente che non reagisce con l'analita, funziona da *carrier* (trasportatore) e passa attraverso una colonna in cui si trova la fase fissa.

([http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20\(metodi%20separazione-cromatografiapdf\)](http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20(metodi%20separazione-cromatografiapdf)))

Alla fine della colonna viene posto un rivelatore in grado di evidenziare le varie sostanze che fuoriescono in tempi diversi emettendo un segnale con una intensità proporzionale alla loro concentrazione, il segnale viene registrato da uno strumento che darà così luogo al cromatogramma (figura 2)

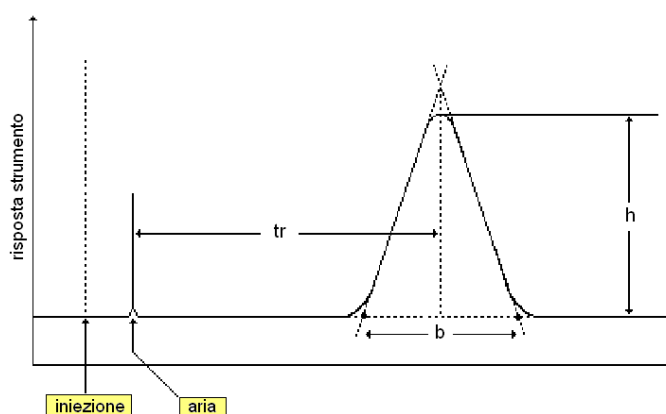


Figura 2: gas-cromatogramma

Le colonne possono essere **capillari**, e allora la fase stazionaria si deposita come una pellicola sulla sottile parete, e il gas (idrogeno, elio, azoto, argon) transita nel lume della struttura tubulare; oppure possono essere **impaccate** con un solido poroso (gel di silice, allumina) o liquido (olio, glicole polietilenico) che imbeve sostanze inerti come la terra di diatomee.

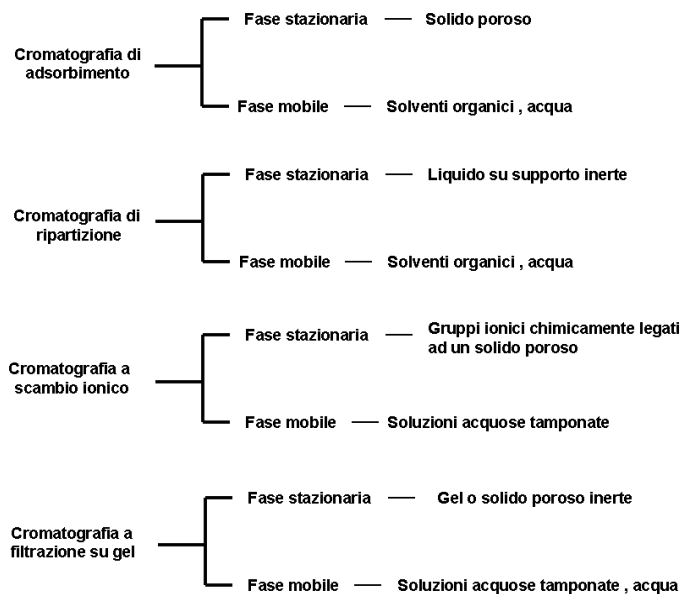
La gascromatografia, come quella su strato sottile che vi si può apparire, è risultata preziosa per il rilevamento di tracce di farmaci o di sostanze d'abuso.

I vantaggi della **cromatografia Gas-liquido (GLC)** in particolare consistono in una strumentazione piuttosto semplice, e la tecnica produce velocemente i suoi risultati. Con colonne capillari la risoluzione è ineguagliabile da altre metodiche e inoltre, essa risulta facilmente interfacciabile con lo spettrometro di massa. (Skoog D.A., West D. M, Holler F.J. 1996).

Cromatografia a fluido supercritico

O cromatografia supercritica, indicata con l'acronimo **SFC**, dall'inglese *supercritical fluid chromatography*, è un tipo di cromatografia nella quale la fase mobile è un fluido supercritico. Si dice essere in uno stato supercritico (*fluido supercritico*) il fluido quando si trova in condizioni di temperatura superiore alla temperatura critica e pressione superiore alla pressione critica. In queste condizioni le proprietà del fluido

sono in parte analoghe a quelle di un liquido (ad esempio la densità) ed in parte simili a quelle di un gas (ad esempio la viscosità). Il potere eluente di un fluido supercritico è superiore a quello di un gas. Per eseguire la SFC possono essere impiegati sia i rivelatori tipici della GC che dell'HPLC. Possono essere impiegate sia colonne capillari che impaccate. Tra gli eluenti più impiegati allo stato supercritico si trova la CO₂ in quanto non tossica, poco inquinante e poco costosa.



(http://www.masterms.it/e107_files/public/pres._crom_agozzino_1.ppt#350,12),

“Spesso non è possibile definire in maniera chiara se la separazione degli analiti avvenga in base ad un processo di adsorbimento o di ripartizione, ovvero entrambi. Si parla quindi di **cromatografia di adsorbimento/ripartizione**, che viene suddivisa, in base alle polarità relative delle due fasi:

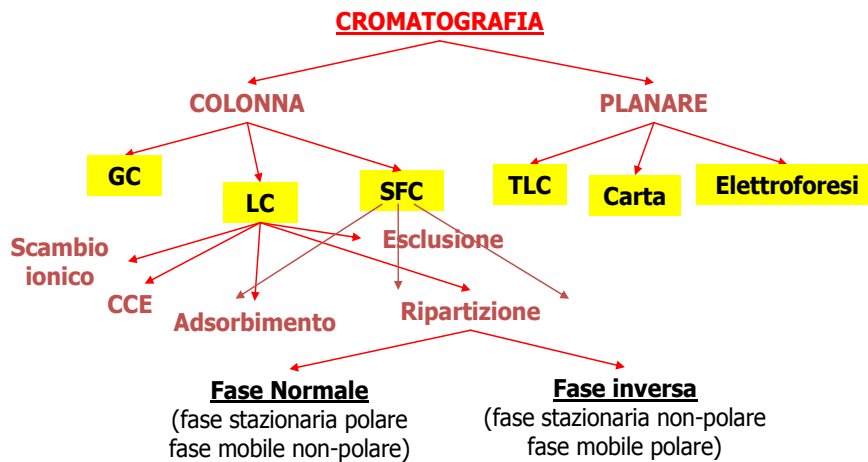
Cromatografia in fase normale: la fase stazionaria è polare (ad es. silice), la fase mobile è non polare (ad es. n-esano o tetraidrofurano). I campioni polari vengono trattenuti nella colonna più a lungo di quelli non polari o poco polari.

Cromatografia in fase inversa (RP): la fase stazionaria è non polare (idrocarburo), la fase mobile è polare (ad es. acqua o alcol). I campioni poco o non polari vengono trattenuti nella colonna più a lungo di quelli polari.

Utilizzando uno o l'altro metodo, l'ordine di eluizione dei composti si inverte, anche se non sempre in maniera esattamente speculare.”

(<https://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id....>) .

TIPI di CROMATOGRAFIA



1.3 La ifenazione

Le tecniche più largamente impiegate nella determinazione delle droghe da abuso sono la cromatografia liquida con rivelatori elettrochimici (HPLC-ED [*high performance liquid chromatography with electrochemical detectors*]); quella con rivelatori a serie di diodi [*diode array detectors* (HPLC-DAD)]; la elettro cromatografia capillare (CEC) –accoppiata a spettrometria di massa “*a tempo di volo*” (CEC-TOF). La gascromatografia o la cromatografia liquida sono spesso accoppiate con alcune tecniche spettroscopiche ed elettrochimiche. Si chiamano comunque, tecniche **ifenate**.

(<http://road.unimol.it/bitstream/2192/31/1/tesi%20dottorato%20Dr.%20Ivan%20Notardonato.pdf>)

Più recentemente pertanto, i metodi si basano sulla cromatografia a gas, o liquida, - con rivelatore a spettrometria di massa, **GC/MS** e con pretrattamento o **derivatizzazione** dei campioni; **HPLC-MS/MS1**; e metodi *ultra high performance liquid chromatography* (**UHPLC**)-MS.

Le matrici analizzate per identificare e quantificare le droghe da abuso, possono essere ottenute tramite tecniche invasive come per il siero ed il plasma, e altre meno invasive, come per le urine, i peli, il fluido orale e il sudore.

Poiché i campioni di urina potrebbero essere soggetti ad adulterazione, con sostituzione, diluizione, o aggiunta di “agenti mascheranti”, un metodo clinico accertato per rilevare le adulterazioni o le diluizioni consiste nella determinazione di tipiche caratteristiche urinarie, come il contenuto di creatinina.

E’ necessario un pretrattamento dei campioni di urina per eliminare specifiche sostanze che possano interferire con la matrice (sostanze endogene simil-proteiche e specie di proteine non volatili).

Ciò al fine di pre-concentrare gli analiti che interessano, e ridurre, quando si usino le tecniche HPLC-MS, possibili soppressioni o aumenti di segnale (effetti) dovuti all'effetto matrice.

L'estrazione liquido-liquido (LLE) della SPE, l'estrazione off-line della fase solida e la SPE on-line sono le tecniche più usate. *La strategia SPE online sembra essere la scelta migliore per incrementare la sensibilità del metodo* e, per accorciare i tempi di pretrattamento ed analisi; ma anche per aumentare il numero di campioni analizzati nello stesso tempo.

La procedura di estrazione on-line, si basa **sull'uso di una colonna di estrazione cationica accoppiata a uno spettrometro di massa ibrido LC-MS**, tramite una valvola di scambio (o di commutazione) a due vie, che esegue il carico e i vari stadi di iniezione.

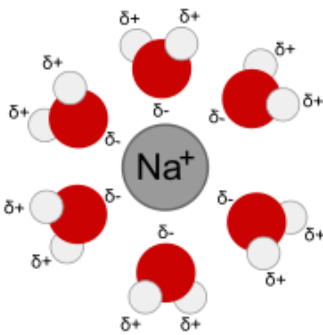
Estrazione in fase solida (SPE)

4 tempi: A. *Condizionamento: metanolo*; B. *Lavaggio: Metanolo, acqua*; C. *Introduzione del campione*; D. *Eluizione : metanolo e tampone acetato a pH 5,5.* (<http://shop.perkinelmer.com/Content/Images/2006/SFDC.>)

La tecnica di estrazione in fase solida avviene **per adsorbimento** ed è adoperata per purificare, isolare e concentrare sostanze presenti in matrici complesse e si basa sulle interazioni tra gli analiti in esame e i gruppi funzionali della fase solida di cui è composta la cartuccia di estrazione.

Occorre far adsorbire in testa alla cartuccia (già "condizionata" con metanolo), la soluzione contenente gli analiti da separare; quindi, la cartuccia viene 'lavata' facendo fluire un solvente in grado di sciogliere ed allontanare tutte le sostanze non trattenute dalla fase stazionaria della cartuccia. **La Solvatazione consiste proprio nel condizionamento e nel lavaggio della cartuccia (metanolo ed acqua).** Infatti gli analiti vengono eluiti e raccolti, adoperando ancora un solvente verso cui presentano un'elevata affinità (metanolo e acetato), dopo l'avvenuta solvatazione.

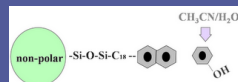
La fase stazionaria della cartuccia di estrazione è caratterizzata non solo dalla natura chimica dei gruppi funzionali, ma anche dalle dimensioni delle particelle che la compongono e dall'impaccamento della cartuccia stessa: minori sono le dimensioni delle particelle, maggiore è la superficie adsorbente in grado di interagire con le sostanze in analisi. L'impaccamento, invece, rende conto della maggiore o minore capacità di separare sostanze di dimensioni variabili. La scelta della composizione chimica e fisica della fase stazionaria è basale per l'ottimizzazione della procedura di estrazione: la fase stazionaria cioè, deve trattenere selettivamente gli analiti di interesse, per poi rilasciarli durante la fase di eluizione (http://www.fedoa.unina.it/1709/1/Castiglia_Ambiente_Prevenzione_e_Medicina_Pubblica.pdf). Nel sistema API 3200Small Benchtop in dotazione la solvatazione delle gocce o particelle avviene nell'interfaccia del *Curtain Gas*, appena fuori della *curtain plate* in regime di pressione atmosferica.



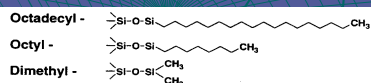
Con il termine di **solvatazione** si intende l'interazione tra il soluto e solvente in modo che ogni molecola di soluto disciolto sia circondato di alcune molecole di solvente, il cui numero dicesi *numero di solvatazione*. In tal modo la solvatazione differisce dalla semplice dispersione. Nella figura, gli ossigeni elettronegativi di 6 molecole d'acqua, si orientano verso l'atomo di Na^+ . Se il solvente è l'acqua si parla anche di **idratazione**.

Interazioni Non-polari

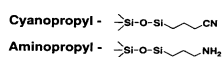
Le interazioni non polari più importanti che possono intercorrere tra fase adsorbente e analita, sono le forze di Van der Waals (interazioni tra i gruppi C-H di analita e adsorbente).



C18 (Octadecil-silano) è l'adsorbente più usato per le interazioni non-polari, non è selettivo e permette di trattenere molti composti non polari. Utilizzato per analisi che necessitano l'estrazione del maggior numero di composti presenti all'interno di una matrice (es. analisi ambientali).



NORMAL PHASE:



22

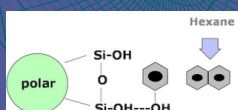
Interazioni Polari

Interazioni polari come i legami idrogeno, forze dipolo/dipolo e molte altre che determinano la distribuzione degli elettroni tra gli atomi presenti nei gruppi funzionali producendo una distribuzione polare delle cariche (+) e (-).

Molecole con gruppi funzionali polari ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $\text{C}=\text{O}$, anelli aromatici, gruppi sulfidrilici, doppi legami e gruppi che contengono eteroatomi come O, N, S, P) interagiscono con i gruppi funzionali polari di opportuni adsorbenti.

Il legame idrogeno è una interazione polare che interviene tra un gruppo che ha un H legato ad un atomo elettronegativo (come l'O oppure l'N) e un altro gruppo con un atomo elettronegativo.

$-\text{OH}$ ed $-\text{NH}_2$ sono i principali donatori di legami idrogeno in grado di interagire con gruppi funzionali che contengono O, N e S.



24

1.3.1 La Spettrometria di Massa

(http://www.fedoa.unina.it/815/1/tesi_di_dottorato_tartaglione.pdf)

La spettrometria di massa consente di misurare le masse molecolari e di determinare quindi la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

Ma è un metodo d'analisi *distruttivo* (la molecola non rimane intatta dopo l'analisi), e soprattutto non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia.

Una molecola di cui si vogliano misurare le proprietà di massa, deve essere prima volatilizzata e ionizzata in una componente dello spettrometro detta sorgente di ionizzazione.

Non si può ottenere una spettrometria di massa se non si producono ioni in fase gassosa che saranno successivamente accelerati fino a raggiungere una velocità specifica mediante un campo elettrico, e poi proiettati in un analizzatore di massa appropriato che separa entità di masse diverse ed infine, verrà così distinto e rivelato in modo sequenziale, ogni composto dotato di carica e con una certa massa. In sostanza, in uno spettrometro di massa il campione è prima ionizzato alla sorgente; L'analizzatore separa poi gli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z). Tutti gli analizzatori di massa lavorano in un vuoto molto spinto.

Poiché gli ioni debbono sussistere in fase gassosa per poter essere individuati e quantificati, a seconda della natura delle molecole da analizzare è richiesta una differente sorgente di ionizzazione.

In spettrometria di massa si indicano dunque con **spettrometria di massa tandem** (o **MS-MS** o **MS/MS** o **MSⁿ**) le tecniche di ri-frammentazioni successive effettuate su ioni-frammenti già analizzati. Si tratta in pratica di ripetere più volte la frammentazione e l'analisi sugli stessi ioni. È utile accoppiare questa tecnica con tecniche di ionizzazione soft, che danno cioè poca frammentazione, soprattutto con quelle tecniche che danno unicamente lo ione molecolare. Il *curtain gas* (gas sipario) è un flusso di gas secco intercorrente che emana come una *cortina*, nello spazio tra due piastre strettamente affrontate, ciascuna con un orifizio centrale, lungo l'asse di una sorgente di ionizzazione spray. Un diagramma della m/z o massa (ascissa) contro l'intensità spesso normalizzata al 100% in base allo ione più intenso rilevato (ordinata), si produce per selezione della trasmissione degli ioni nell'analizzatore per definiti intervalli di valori m/z in un dato periodo di tempo.

Il funzionamento dello spettrometro di massa

Lo spettrometro di massa è dunque uno strumento che produce ioni e li separa in fase gassosa in base al loro rapporto massa/carica (m/z). Un'analisi mass-spettrometrica può essere rappresentata dai seguenti passaggi:

Introduzione del campione – Ionizzazione – Analisi della massa – Rivelazione degli ioni/analisi dei dati.

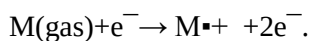
(http://w3.uniroma1.it/biocmed2/elettive/Cromatografia_TDM.pdf, 10/52 diapos.).

Le fasi per la determinazione di ioni atomici e/o molecolari durante la separazione sono:

-la generazione di atomi o molecole, o ancora i loro frammenti in fase gassosa

- la ionizzazione della sostanza
- la separazione in base al rapporto massa/carica
- la rivelazione della corrente ionica

La Ionizzazione elettronica spiega la formazione dello **ione molecolare**



Lo ione molecolare è pertanto quello che si forma dalla molecola di analita per rimozione di un elettrone, e lo si può trovare ad un valore di m/z corrispondente alla massa dell'analita; anzi esso è un indicatore diretto del suo peso molecolare.

Da qualche parte nello ione ci sarà dunque un singolo elettrone spaiato. Questa infatti è una metà di quella che era originariamente una coppia di elettroni - l'altra metà è l'elettrone che è stato rimosso nel processo di ionizzazione.

Gli ioni molecolari sono energeticamente instabili, e vanno soggetti a frammentazione. Il caso più semplice è quella di uno ione molecolare scisso in due parti - uno dei quali è un altro ione positivo, e l'altro è un radicale libero senza carica.

Un radicale libero è un atomo o gruppo di atomi che contiene un singolo elettrone spaiato. Solo le particelle cariche saranno accelerate, deviate e rilevate dallo spettrometro di massa. Le particelle scariche vanno semplicemente a perdersi nella macchina e alla fine, vengono rimosse dalla pompa a vuoto. Le masse molecolari degli isotopi più abbondanti (zolfo, cloro, bromo), hanno sempre valore pari, a meno che non sia presente un numero dispari di atomi di azoto (Robert M. Silverstein; Francis X. Webster, David J. Kiemle. 2006). La cosiddetta **regola dell'azoto** è una regola empirica per determinare la composizione elementare dei composti organici (contenenti C, H, O, S, Si, P, alogeni e N).

L'azoto (N) in buona sostanza è l'unico tra gli elementi considerati con peso atomico pari e numero di valenza dispari. Così si evince che ***un composto con un numero dispari di atomi di azoto ha peso molecolare di valore dispari, un composto con un numero pari di atomi di azoto ha peso molecolare di valore pari.*** Di conseguenza, se il peso molecolare dell'analita è dispari contiene un numero dispari di atomi di azoto; se invece il peso molecolare dell'analita è pari non si può sapere se l'analita contenga o no azoto.

In pratica, il picco più evidente in uno spettro di massa si può riferire allo ione molecolare. Ipotizzando ragionevolmente che tutti gli ioni prodotti dall'analisi abbiano carica singola, gli spettri mostrano le varie abbondanze ioniche riportate in rapporto al **picco base**, che è il picco più abbondante osservato nello spettro. Questo picco più alto (**picco base**) si fissa al valore 100, a prescindere dal suo valore assoluto (<http://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id...> A.A.2012-13, 13.1, p. 3.). Invero, il picco base non sempre coincide con il **picco molecolare** o **picco genitore**, posto generalmente subito accanto, che corrisponde appunto alla molecola ionizzata (cioè, allo ione molecolare) e che consente di stabilire il peso molecolare dell'analita. Per effetto induttivo o per risonanza, più uno ione molecolare è stabilizzato, maggiore

è la sua probabilità di giungere intatto al rivelatore, in abbondanza. Dall'abbondanza del *picco genitore* è possibile già ipotizzare a quale classe di composti appartenga l'analita (Fred W. McLafferty. 1972).

Scopi della spettrometria di massa

- Determinazione del peso molecolare
- Delucidazione della struttura molecolare
- Identificazione di componenti di una miscela
- Indagini quantitative
- Studi meccanicistici
- Studio di interazioni intermolecolari.

Riassumiamo l'iter del campione. Esso, una volta vaporizzato, passa nella camera di ionizzazione.

Gli ioni vengono poi trasferiti dalla sorgente all'interno della camera di vuoto passando per un piccolo orifizio che è protetto da un flusso di azoto altamente puro chiamato "curtain gas". L'orifizio è l'unico accesso alla camera di vuoto attraverso il quale possano passare gli ioni e un piccolo volume di particelle neutre; il *curtain gas* permette agli ioni di entrare ma ostacola il passaggio di molecole di campione e solvente, inoltre crea una regione asciutta che favorisce l'azione di *declustering* [il rendere disomogeneo un determinato gruppo delle molecole di solvente dagli ioni, o in altri termini, lo staccare gli ioni dalle molecole del solvente e dall'acqua]. Gli ioni entrano nell'interfaccia e poi nella camera di vuoto grazie ad un gradiente elettrico stabilito applicando dei voltaggi elettrici agli elementi ottici posti lungo il percorso ionico.

È importante che gli ioni prodotti nella camera di ionizzazione abbiano una corsa libera attraverso la camera di vuoto senza, cioè, colpire molecole d'aria. Le particelle del campione (atomi o molecole) sono quindi bombardate con un fascio di elettroni, e alcune delle collisioni sono abbastanza energetiche per gettare uno o più elettroni

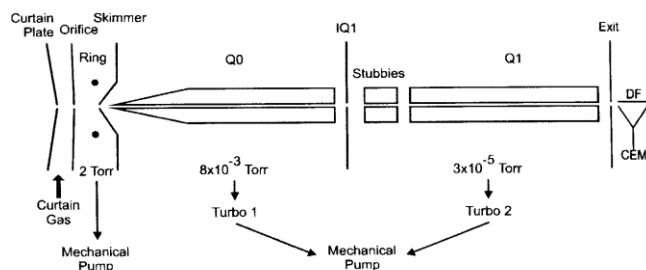
su particelle del campione, per farne ioni positivi. La maggior parte degli ioni positivi formati porterà una carica di +1, perché è molto più difficile rimuovere ulteriori elettroni da uno ione già positivo . Questi ioni positivi sono spinti fuori nel resto della macchina da un'altra piastra metallica che respinge gli ioni perché dotata di una leggera carica positiva . Come si può constatare, l'intera camera di ionizzazione è mantenuta ad una tensione positiva di circa 10.000 volt.

Gli ioni positivi sono costretti a passare attraverso tre fessure, tra cui l'ultima che è a 0 volt. La fessura centrale comporta qualche valore intermedio di tensione e infine tutti gli ioni vengono così accelerati in un fascio finemente focalizzato.

I voltaggi sono applicati al *curtain plate* (quella piastra che normalmente si smonta e si pulisce) all'orifizio e al *focusing ring* (anello di focalizzazione). Il **potenziale di voltaggio** è presente pertanto tra l'orifizio e lo skimmer (collegato a terra) : Lo **skimmer** (scrematoio, spannatore, schiumatore) è un dispositivo capace di leggere e in certi casi immagazzinare su una memoria i dati, mentre gli ioni concentrati passano attraverso di esso; esso definisce il **declustering potential**. Più è grande il **DP**, maggiore è l'energia trasmessa agli ioni per staccarsi dalle molecole di acqua e solvente alle quali sono attaccati.

Alta Pressione

Alto Vuoto



La regione ad alta pressione (mantenuta circa a 8×10^{-3} torr) contiene il quadrupolo con solo RF, il **Q0**; la regione ad alto vuoto contiene il prefiltro *stubbies* e il filtro di massa quadrupolo Q1 (mantenuta circa a 3×10^{-5} torr).

Lo scopo del *focusing ring*, anche chiamato **focusing potential FP** è di assistere, stabilizzare e **concentrare gli ioni**, farli passare attraverso lo skimmer per arrivare nella camera di vuoto.

Se consideriamo un singolo **quadrupolo**, il percorso ionico attraverso la camera di vuoto è assicurato da:

- Un quadrupolo **Q0** al quale è applicata solo radiofrequenza
- prima lente interquadrupolare **IQ1**
- pre filtro quadrupolare (**stubbies = mini prefiltri piuttosto tozzi**)
- filtro di massa quadrupolare **Q1**

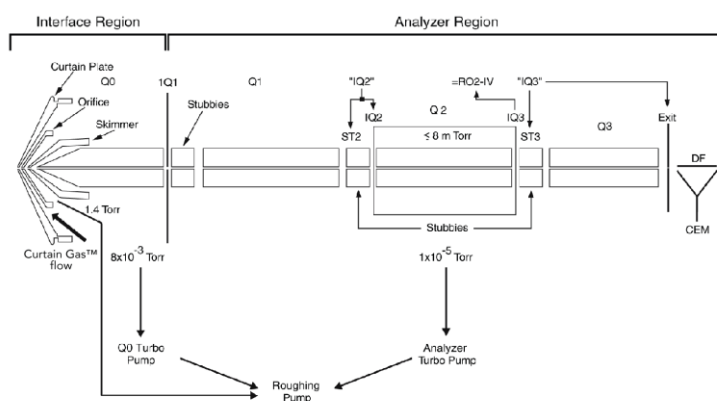
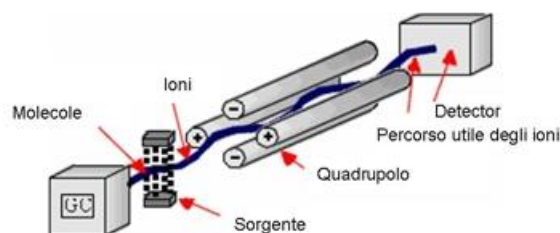
I quadrupoli e le lenti ottiche associate sono montate su di un binario inserito all'interno di una camera di vuoto (vacuum).

L'**analizzatore di massa a quadrupolo** è solo un tipo di analizzatore impiegato nella spettrometria di massa. Nello spettrometro di massa l'analizzatore di massa quadrupolare è il componente dello strumento responsabile di convogliare gli ioni del campione in esame al rivelatore, sulla base del loro **rapporto massa/carica (m/z)**. Un analizzatore di massa è essenzialmente **un filtro** di massa (QMF=Quadrupole Mass Filter) capace di trasmettere **solamente lo ione prescelto**. Uno spettro di massa si ottiene esplorando in sequenza il campo di massa di interesse (scansione). Questo tipo di analizzatore è il più utilizzato negli spettrometri di massa per analisi di routine. Ha risoluzione unitaria.

Un quadrupolo è composto da quattro barre parallele di metallo, per lo più, in molibdeno. Alle barre viene applicata una tensione continua, le barre opposte diagonalmente hanno la tensione dello stesso segno, a questa viene sovrapposta una tensione alternata con frequenza nell'ordine dei megahertz (radiofrequenza [RF]). Il campo elettrico che risulta costringe gli ioni a percorrere una traiettoria oscillante diversa per ogni valore di m/z . Regolando questo campo si può selezionare il valore di m/z degli ioni che attraversano il quadrupolo, gli ioni con m/z superiore o inferiore al valore prescelto saranno costretti a percorrere traiettorie che portano fuori dal campo elettrico e quindi non raggiungeranno il rivelatore. Ciò consente la **selezione di un particolare ione**, oppure la scansione delle m/z variando con continuità il campo elettrico.

La camera di vuoto (vacuum) è divisa in due distinti segmenti con due differenti pressioni, una regione ad alta pressione e una regione ad alto vuoto. La regione ad **alta pressione** (mantenuta circa a 8×10^{-3} torr) contiene il quadrupolo con solo RF, il Q0; la regione ad **alto vuoto** contiene il prefiltro *stubbies* e il filtro di massa quadrupolo Q1 (mantenuta circa a 3×10^{-5} torr).

Questa disposizione delle due camere è un brevetto depositato e permette agli ioni di entrare nella regione di alto vuoto e nel filtro di massa con una bassa energia assiale e cinetica, caratteristiche ottimali per effettuare analisi di massa di ioni. Lo *stubbies* focalizza gli ioni facendoli entrare nel quadrupolo Q1, qui gli ioni vengono selezionati in relazione al loro rapporto m/z , e solo gli ioni filtrati andranno verso il detector con una traiettoria di foggia sinusoidale.



API 4000™ system ion optics path (Percorso ottico del sistema ionico) p. 40/110

(<http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/4000-api-hardware-guide.pdf>, 40/110.)

Il triplo quadrupolo contiene gli stessi componenti di un singolo quadrupolo con addizionato **un secondo filtro di massa Q3**. La regione ad alta pressione è la stessa, ma **la regione ad alto vuoto contiene lo stubbies** (che è un **mini quadrupolo prefiltro**) e i filtri di massa Q1 e Q3 i quali sono separati sul binario da una cella di collisione. La cella di collisione è una camera in ceramica all'interno della quale è racchiuso un quadrupolo Q2 (scritto anche q2 o *collision cell*) al quale è applicata esclusivamente radiofrequenza e quando viene pressurizzata con il CAD (*Collision Activated Dissociation*) gas (azoto) si crea una regione locale ad alta pressione nella quale avviene la frammentazione degli ioni. Gli ioni seguono lo stesso percorso di un singolo quadrupolo fino a raggiungere il Q2 (con solo RF) contenuto nella cella di collisione, e solo gli ioni selezionati

arrivano nel Q2. Il quadrupolo Q2 (RF) è separato dai due filtri di massa Q1 e Q3 tramite delle lenti³ chiamate IQ2 e IQ3 o ST3 (dipende dalla serie del quadrupolo). Il Q2 non ha la capacità di operare come filtro di massa e quindi opera in modalità *Total Ion*, se il CAD gas non è presente, gli ioni attraversano il Q2 e vanno direttamente nel Q3, se invece il Q2 viene pressurizzato con il CAD gas (azoto) e viene applicato un voltaggio tra le lenti di entrata e il Q2 (CE, *collision energy*) si **fornisce agli ioni l'energia che favorisce la frammentazione** nel momento in cui questi vanno a collidere con le molecole di azoto. Il Q2 è in altre parole un acceleratore lineare: collision cell = LINAC™(LINear ACcelerator).

Il Q2 LINAC elimina la perturbazione diafonica dovuta al rumore di fondo e permette uno scanning MS tandem senza perdita di sensibilità. Infatti il CEM Detector (Channel Electron Multiplier) in dotazione è esente da rumore parassita, mentre il semplice detector analogico filtra solo il segnale impostando una soglia per la lettura dello stesso. Ma sfortunatamente non è in grado di registrare gli impulsi mono-ionici. (AB Applied Biosystem, MDS SCIEX, 2008.)

Sorgenti di ionizzazione

Dal sistema di ionizzazione prescelto dipende anche il numero, la natura e l'abbondanza dei frammenti molecolari che compaiono nello spettro di massa.

Alcune tecniche consentono di analizzare solo ioni positivi, altre invece, permettono la rivelazione anche di ioni negativi. Le più potenti, operano cioè ad alta energia e portano ad una frammentazione spinta (*Tecniche Hard*), altre invece operano a bassa energia producendo un numero inferiore di ioni (*Tecniche Soft*). In base al tipo di sorgente utilizzata, la ionizzazione primaria del campione viene realizzata in vario modo; le tecniche più utilizzate sono:

1. Impatto elettronico (E.I.)
2. Ionizzazione chimica (C.I.)
3. Bombardamento con atomi veloci (F.A.B.)
4. Desorbimento con laser (M.A.L.D.I.)
5. Electrospray (E.S.I.)

In particolare sono utilizzate tecniche di ionizzazione ESI (*Electro Spray Ionization*) e TIS (*Turbo Spray Ionization*). (http://www.fedoa.unina.it/815/1/tesi_di_dottorato_tartaglione.pdf: ANALISI DI BIOTOSSINE MARINE etc. XVIII CICLO 2002-2005)

1.3.2 Tecniche di ionizzazione

(http://gauravtrivedi.weebly.com/uploads/5/5/8/0/5580973/api_4000_course.pdf..)

Ionizzazione Elettrospray (ESI)

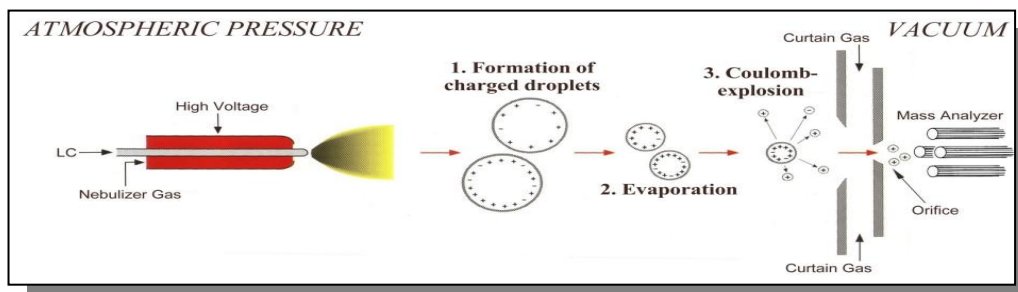
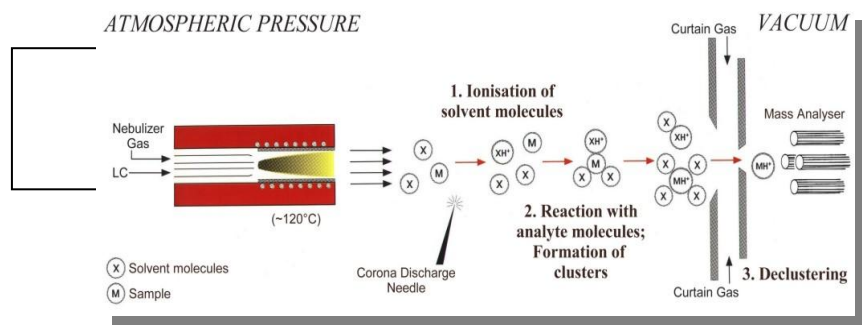
Sono disponibili varie tecniche per ionizzare molecole volatili (ionizzazione elettronica, EI e chimica, CI) e altre, come l'*electrospray* (ESI), la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI), la fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI), la **ionizzazione laser assistita da una matrice (MALDI) per la ionizzazione di molecole polari**. Infine, il Bombardamento con atomi veloci (*Fast Atom Bombardment*, o FAB).

In base all'energia impiegata, le tecniche di ionizzazione sono dunque raggruppabili in due grandi categorie: *hard* e *soft*.

Tecniche di ionizzazione	
<i>Hard</i>	<i>Soft</i>
EI	ESI, APCI, APPI, MALDI, ..
Grande eccesso di energia sullo ione molecolare $[M]^+$ Estesa frammentazione	Molecole protonate $[M+H]^+$ / deprotonate $[M-H]^-$ con minimo eccesso di energia

AB Applied Biosystems: studio per il sistema in dotazione

(Module 3 Théorie A Support Specialist Approach, diap. 18 e 54/146, AB Applied Biosystems 2006. Advanced Instrument Optimisation and Theory in LC-MS/MS Quantitation. MDS SCIEX.)



L' **Electrospray ionisation (ESI)** è una delle più fini tecniche di ionizzazione e ionizza polarmente alle sostanze ioniche.

Inizialmente la corrente del solvente passa sotto un ago carico così che la superficie del flusso diventa carica con la stessa polarità del voltaggio applicato all'ago. Questo flusso allora si mescola con una corrente di gas che forma quasi un cono su misura con dentro le gocce cariche.

Queste muovono verso l'entrata della regione del vuoto (*vacuum*) a causa della loro velocità iniziale e della differenza di potenziale tra l'ago e la piastra del curtain gas (*curtain plate*). Così che le gocce nel loro movimento, si restringono per l'evaporazione del solvente.

Al punto critico, le cariche sulla superficie delle gocce divengono sempre più serrate l'una all'altra. Poiché le cariche uguali si respingono, **ciascuna goccia subisce una esplosione di Coulomb** e le cariche degli analiti realmente ionizzati vengono liberate. Gli ioni degli analiti allora entrano nella regione del vacuum del sistema.

E' una tecnica ampiamente usata per l'analisi di biomolecole idrosolubili, molto polari o addirittura cariche e per realizzare l'accoppiamento tra HPLC (*high performance liquid chromatography*) e spettrometria di massa. Nella sorgente electrospray il campione è introdotto come soluzione in un solvente volatile (metanolo [alcol metilico CH_3OH], acqua, aceto nitrile [CH_3CN], o loro

miscele), contenente un acido organico debole (acido acetico [CH_3COOH], acido formico [HCOOH] etc.) a bassa concentrazione.

Tale soluzione viene spinta attraverso un ago capillare, che è caricato ad un elevato potenziale, e uscendo dall'ago va incontro a nebulizzazione cioè formazione di uno

spray costituito da micro-goccioline di solvente che contengono delle specie ionizzate (analita carico). La ionizzazione a pressione atmosferica, di solito è spontanea, ma può essere incrementata con l'aggiunta di opportuni reagenti. Nella sorgente il gas (azoto) transita a bassa velocità per facilitare l'evaporazione del solvente, e questo permette di trattare anche composti termicamente labili. Man mano

che il solvente contenuto nelle goccioline evapora, queste si rimpiccioliscono fino a che la repulsione elettrica, che aumenta per forte densità di carica, supera la tensione superficiale della goccia; a questo punto, come già detto, la gocciolina "scoppia", creando una corrente di ioni nudi che vengono poi indirizzati verso l'analizzatore a motivo di un gradiente di campo. E' possibile ottenere sia ioni positivi (protonati [+]) che ioni negativi (deprotonati [-]) a seconda se l'ago è caricato ad un potenziale positivo o negativo dello stesso ordine di grandezza (KV).

Ne risulta uno spettro in cui i picchi principali sono dovuti allo ione molecolare recante una o più cariche (specie multi-carica) e a suoi addotti con il solvente o con i sali (Na^+ , K^+ , NH_4^+ nella modalità a ioni positivi e Cl^- , HCOO^- nella modalità a ioni negativi). La presenza di tali addotti è utile da un punto di vista qualitativo nell'identificazione dello ione pseudo-molecolare, ma nell'analisi quantitativa la presenza di tali addotti provoca un abbassamento di sensibilità e va perciò evitata.

Infine esiste una tipologia di ESI ad alto flusso: **TIS (Turbo Ion Spray)** che permette di incrementare la velocità di evaporazione del solvente mediante **immissione controcorrente di un flusso di aria riscaldata**. Questo permette di operare a flussi di anche 1-5ml/min senza necessità di frazionare, suddividere un insieme di dati particolarmente grande ("splittare").

APCI

Atmospheric Pressure Chemical ionisation (APCI) for Quantitation **(Ionizzazione chimica a pressione atmosferica per quantificazione)**

Se la scarica elettrica a corona funziona nella modalità positive causa una rimozione dell'azoto e di ossigeno atmosferico, formando ioni N_2^+ , O_2^+ . L'inverso avviene nella modalità negativa con aggiunta di elettroni e alle molecole del gas.

In una serie complessa di reazioni a catena gli ioni del gas, cioè, N_2 e O_2^+ reagiscono con il solvente (H_2O , CH_3OH) formando ioni reagenti, e cioè, H_3O^+ , CH_3OH_2^+ . L'inverso avviene nella modalità negativa per l'aggiunta di un elettrone alle molecole del gas.

Nella modalità positive il H_3O^+ , CH_3OH_2^+ protonato [aggiunta di uno o più idrogenioni +]forma l'analita $[\text{M}+\text{H}]^+$. Nella modalità negativa i corrispondenti anioni sono de-protonati formando l'analita .

Il *Curtain gas* (gas “sipario”) allora scontra e poi disperde le molecole del solvente sparpagiate intorno agli ioni dell’analita. Gli ioni entrano nella regione del vuoto (*vacuum*) del sistema LC/MS/MS.

Photospray™ Ionisation for Quantitation: APPI (fotoionizzazione a pressione atmosferica o **Atmospheric Pressure Photo-Ionisation**)

(http://europe.appliedbiosystems.com/europe/biosystems/pdf/iss9/biosol_iss9_quantitation.pdf.)

Nella metodica di **ionizzazione con foto spray (TM=Tandem-Mass Spettrometry) per la quantificazione**, gli ioni sono generati da raggi UV invece che dalla scarica a corona.

Inizialmente sviluppata dalla Sciex in collaborazione con Andreas Bruins, il metodo consiste sostanzialmente di una sorgente modificata di APCI (*Atmospheric Pressure Chemical ionisation*) dove l’ago di scarica a corona è stato rimpiazzato da una lampada ad UV. Nella tecnica fotospray, la lampada ad UV usata è una lampada a Krypton, ciò comporta normalmente che l’aggiunta di un dopante nel vapore del gas e dalla sonda del dopante il getto uscendo guadagna ancora una carica che viene trasferita all’analita.

Ion Transfer Through the LC-MS/MS System

Il sistema API 2000™ LC/MS/MS aumenta il potere e il rendimento della spettrometria di massa con triplice quadrupolo. Ad una pressione atmosferica di ionizzazione API 2000/ 3000 si interfaccia il proprio spray con un angolo a 45 ° rispetto al piatto dell’orifizio e al curtain gas (disegnato verticalmente nel tipo 2000 e orizzontalmente nel 3000). Su un API 4000 si deve interporre il proprio spray ortogonalmente ad un angolo cioè, di 90° rispetto all’orificio conico di uscita e alla piastra del curtain gas.

Entrambi API 2000 e 3000 hanno un anello di focalizzazione e non sono in ceramica, con un riscaldamento integrato nel tipo 2000, ma non nel 3000.

Nei sistemi 3000/2000 la *curtain plate*, e l’assemblaggio dell’orificio non sono avvitati allo *skimmer* insieme, e non sono a sgancio rapido a differenza del 4000 in cui l’interfaccia è fatta di materiale ceramico inerte, con riscaldamento integrato che consente una più facile manutenzione .

L’orifizio in un API4000 è più largo che nei precedenti sistemi (ID 320 μm) e ne risulta un incremento fondamentale per la turbo pompa ad interfaccia più grande e non c’è necessità di un anello focalizzatore, poiché, la superficie è conica e il Q0 vi si conforma, contribuendovi altresì la distanza tra l’orificio e lo skimmer; e infine la lente Q0 è molto più piccola che negli altri sistemi.

Quando la corrente del gas viaggia dall’atmosfera al vuoto la corrente si espande e il flusso aumenta la sua velocità oltre quella del suono (Mach disk). Al bordo del cono di espansione del gas, la pressione è più alta. Se l’orificio è appena bloccato, lo spray e il cono del gas simmetricamente è non più allargato intorno all’orificio, ma lo è ancora rispetto all’asse della zona di alta pressione; allora in sostanza il cono si trova più in linea con la rotaia del quadrupolo e si osserva uno stato pressorio più altamente dettagliato.

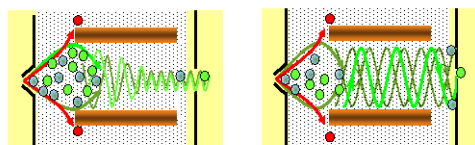
Sull’asse della regione di campionatura dei sistemi 3000/2000, lo spazio di distanza tra la piastra dell’orificio e lo skimmer è più larga richiedendo un anello di focalizzazione per mantenere uno stretto fascio di ioni,

dissimile da quello del sistema 4000. (Module 3 Théorie A Support Specialist Approach, diap. 100/146, AB Applied Biosystems 2006. Advanced Instrument Optimisation and Theory in LC-MS/MS Quantitation. MDS SCIEX.)

[Nella trattazione dei Materiali e dei Metodi facciamo cenno al **sistema API 3200 in dotazione al nostro laboratorio**. (3200 QTRAP® LC/MS/MS System, *Hardware Guide*, D1000092202C, Release Date: July 2011)



Patented Collisional Focussing vs. Conventional Ion Guides



- **Collisional Focussing**
 - dampens beam amplitude
 - Focussed ion beam
 - improved transmission
- **Conventional Ion Guides**
 - poorer ion transmission (ions are lost)

100

© 2006 Applied Biosystems

Collisional Focusing

Gli ioni in uscita dallo skimmer vengono raffreddati e focalizzati nel Q0. Per la presenza di azoto (Curtain Gas) in una certa percentuale, aumenta la pressione che favorisce la trasmissione degli ioni nel Q1.

Mentre Yost and Enke erano responsabili della presentazione iniziale della tecnica con il triplice quadrupolo alla comunità analitica nel 1979, fu lo sforzo combinato di Don Douglas (Sciex) and Barry French, Università di Toronto (*Aerospace Studies*) (http://www.nserc-crsng.gc.ca/_doc/Reports-Rapports/resbus_e.pdf) che risultò notevole in questo, e piuttosto spettacolare. (<http://www.sciencedirect.com/science/journal/10440305>) (Journal of the American Society for Mass Spectrometry), nel 1992. Riguardo poi al nascente progetto, nell'impeto di un futuro sviluppo del triplice quadrupolo della Sciex, tale risultato era piuttosto inaspettato.

Ci si attendeva infatti che, sebbene spargendo la perdita delle sezioni X in quadrupoli a radiofrequenze, essa sarebbe stata piuttosto piccola (2A2) ad alta pressione, ci si poteva attendere tuttavia una certa perdita di ioni. Comunque, dall'ispezione del rapporto tra la pressione del gas in un sistema a radiofrequenza ad un solo quadrupolo e la risposta di uno MS, Douglas e French si accorsero facilmente che aumentando la pressione del gas ne risultava un concomitante aumento nella efficienza di trasmissione degli ioni; circa 70x tra 7-8 mTorr. Tale aumento di efficienza nella trasmissione in funzione della pressione si osservava soltanto a basse energie di iniezione (1-30 eV). I suddetti fenomeni furono attribuiti ad un effetto focalizzatore collisionale, analogo allo smorzarsi delle traiettorie ioniche, sia in senso assiale che radiale in una trappola ionica.

Comunque, nel caso del quadrupolo lineare, tale focalizzazione si manifestava principalmente nello smorzamento radiale del movimento ionico. Si notò insomma che ad alte energie di iniezioni, la trasmissione cadeva; se la tecnica è efficiente, le collisioni sono sufficientemente energetiche per spingere gli ioni fuori del quadrupolo.

Era noto che ad alte energie d'iniezione, cadeva l'efficienza di trasmissione; in luogo della supposizione di una messa a fuoco collisionale, ad alte energie d'iniezione le collisioni sono sufficientemente energetiche per far

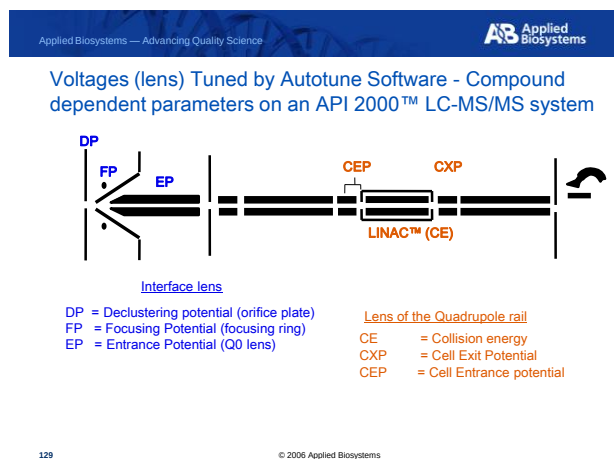
disperdere gli ioni fuori del quadrupolo, o per condurre possibilmente ad un evento CAD (*Collision activated dissociation*).

Come in una trappola per ioni, esattamente come indicano le curve di arresto, l'effetto di messa a fuoco collisionale ha una netta conseguenza sulla distribuzione assiale KE. Mentre questo lavoro iniziale migliorava drammaticamente l'efficienza di trasmissione di una semplice guida del quadrupolo RF [o rf = radiofrequenza], esso risultava significativo esclusivamente per il campionamento di ioni generati a pressione atmosferica.

Le idee e le conclusioni raggiunte da Douglas e French, giuocherebbero un ruolo maggiore nel disegno di nuova generazione di Sciex's, per le *celle ad alta pressione di collisione*". (http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5989-4894_ITE.pdf)

«Il quadrupolo può essere usato in 2 modalità : nella SIM (*single ion monitoring*) o per Scan. La modalità SIM è anche detta SIR (*single ion recording*).

Nella modalità SIM, i parametri (ampiezza della corrente alternata [dc] e del voltaggio RF) sono modulati per osservare una specifica massa, o una selezione di masse specifiche. Codesta modalità fornisce la più alta sensibilità agli utenti interessati per la ricerca di specifici ioni o di frammenti, poiché si può impiegare più tempo per studiare ogni massa. Questo tempo può essere regolato; esso si chiama "*dwell time*", cioè, "tempo di sosta" o di permanenza» nel quadrupolo. (<http://chemweb.ucc.ie/mass%20spec/MS%20summary.pdf>, p. 11.)



(Module 3 Théorie A Support Specialist Approach, diap. 119/146, AB Applied Biosystems 2006. Advanced Instrument Optimisation and Theory in LC-MS/MS Quantitation. MDS SCIEX

Bombardamento con atomi veloci (*Fast Atom Bombardment*, o FAB)

Nella fattispecie (FAB), un raggio di particelle neutre ad elevata energia è diretto contro una pellicola di campione distesa su un supporto metallico. L'urto produce improvvisamente un intenso aumento termico la cui

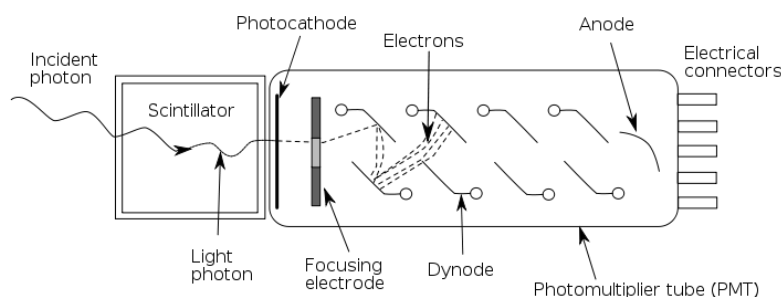
energia viene dissipata interessando gli strati più esterni della superficie del campione. Sono stati usati all'inizio atomi neutri di gas argon o xenon; oggi si adopera un raggio di ioni cesio (Cs^+). I raggi primari sono costituiti sia da atomi neutri (FAB, *fast atom bombardment*) sia da ioni (FIB, *fast ion bombardment*); una variante è la LSIMS, *liquid secondary ion mass spectrometry* o *SIMS*). La matrice liquida usata in tal caso, - es.: glicerolo- rinnova in continuo lo strato superficiale della molecola in contatto diretto con il raggio bombardante, e prolunga così il periodo della produzione degli ioni. La ionizzazione ha preso origine come tecnica dalla spettrometria di massa a ioni secondari (*SIMS secondary ion mass spectrometry*) in cui le molecole di campione, adese ad una superficie, sono urtate da ioni con elevata energia. Come risultato finale si hanno raggi di ioni secondari con intensità sufficiente per strumenti a scansione e le rotture di legami producono inoltre ioni frammento. La cascata di collisioni che ha origine dall'impatto dell'atomo veloce causa abbondanti ionizzazioni nella matrice. Non è però una tecnica *soft*.

1.3.3 Analizzatori

L'analizzatore è quel settore dello spettrometro di massa in cui avviene la selezione degli ioni, formati nella sorgente di ionizzazione, sulla base del rapporto m/z (massa/carica). Gli ioni con differente m/z arriveranno al **rivelatore** con differente velocità, cioè, in tempi diversi, apparendo nello spettro a valori differenti. (http://www.fedoa.unina.it/815/1/tesi_di_dottorato_tartaglione.pdf)

Funge da collettore e rivelatore degli ioni comunemente un moltiplicatore elettronico, costituito da una serie di elettrodi in cascata, ciascuno caricato ad un potenziale superiore al precedente. Quando uno ione collide sul primo elettrodo questo emette un fascio di elettroni che vanno a colpire il secondo elettrodo, cioè, il primo del *dinodo*, il quale a sua volta emette una quantità maggiore di elettroni e così via. Il risultato è una forte amplificazione del segnale che viene poi digitalizzato ed elaborato infine dal calcolatore dello spettrometro. Il primo elettrone emesso per effetto fotoelettrico subisce una accelerazione a causa del campo elettrico e acquisisce energia cinetica. La struttura del sistema è progettata in modo che ciascun elettrone emesso da un elettrodo venga accelerato e provochi l'emissione di diversi elettroni dall'elettrodo successivo.

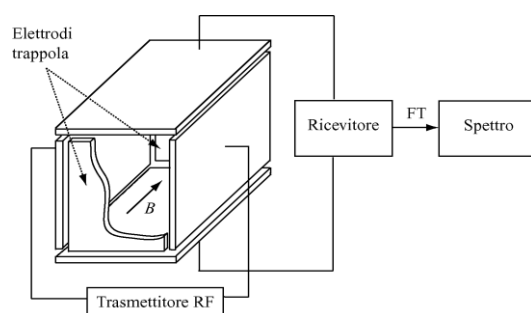
Un singolo fotone che colpisce il tubo provoca così il passaggio di moltissimi elettroni.



(<http://it.wikipedia.org/wiki/File:Photomultipliertube.svg>.)

Gli analizzatori possono comunque essere classificati in base al modo in cui effettuano la selezione ionica in:

1. **Analizzatori a risonanza ciclotronica ionica (FT ICR [*Risonanza Ciclotronica Ionica a Trasformata di Fourier*])**
2. **Analizzatori a deflessione magnetica (doppia focalizzazione).**
3. **Analizzatori a quadrupolo**
4. **Analizzatori a trappola ionica**
5. **Analizzatori a tempo di volo (TOF)**



Analizzatore a risonanza ciclotronica ionica [Spettrometro a trasformata di Fourier] (FTMS)

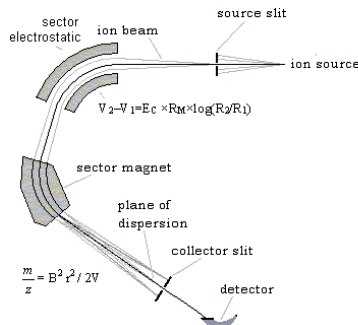
La cella dello spettrometro è costituita da tre coppie di elettrodi disposti sulle facce opposte di un cubo. Due elettrodi servono a intrappolare gli ioni in una regione di intenso campo magnetico B generato da un criomagnete. Naturalmente nel caso del metodo FTMS il sistema di rivelazione è invece un ricevitore di radiofrequenza, che a sua volta è collegato al calcolatore per l'analisi di Fourier dell'interferogramma, da cui si ottiene lo spettro di massa. Il metodo viene certe volte descritto anche come ***Risonanza Ciclotronica Ionica a Trasformata di Fourier***, FT-ICR.

(<http://www.uniurb.it/MedChem/Gatti/massa.doc>)

Analizzatori a deflessione magnetica (a doppia focalizzazione)

La separazione degli ioni, si compie dapprima in un settore elettrostatico (6-8KV), dove il campo elettrico accelera gli ioni avviandoli in un condotto ricurvo. Ma il settore elettrostatico funge da filtro di velocità. L'Energia cinetica (E_c) si calcola come: $V = V_2 - V_1 = E_c / RM \log.(R_2/R_1)$. **Invece il campo (settore) magnetico induce una deflessione degli ioni accelerati in base alla loro massa.** La vera separazione degli ioni avviene nel settore magnetico mentre essi sono soggetti, per il percorso circolare, alla forza centrifuga e insieme, a quella centripeta per il campo magnetico. Combinando le 2 equazioni si avrebbe

come abbiamo accennato $m/z = B^2 r^2 / 2V$. (<http://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id...>
A.A.2012-13, 13.1, p. 6.)



<https://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id=30326>

Gli ioni sono di conseguenza deflessi dal campo magnetico per diversi fattori . La quantità di deflessione dipende infatti da:

- la massa dello ione. Ioni più leggeri vengono deviati di più di quelli più pesanti .
- la carica dello ione .

Ioni con 2 (o più) cariche positive vengono deviati più di quelli con sola carica positiva. Questi due fattori sono combinati nel rapporto massa / carica .

Ad esempio, se uno ione aveva una massa di 28 e una carica di 1 + , il suo rapporto massa / carica sarebbe 28 .

Uno ione con una massa di 56 e una carica 2 + avrebbe egualmente un rapporto massa / carica di 28 .

Assumiamo che la carica su tutti gli ioni è 1 + . **La maggior parte degli ioni che passa attraverso lo**

spettrometro di massa avrà una carica di 1 + , in modo che il rapporto massa / carica sarà uguale alla massa dello ione .

E' necessario essere consapevoli della possibilità di 2 + (etc.) ioni , ma la stragrande maggioranza degli spettri di massa coinvolgono ioni protonati 1+. E' possibile ragionevolmente supporre che gli ioni di cui si sta parlando avranno per lo più una carica di 1 + . Per portare quelli con un grande valore m / z (gli ioni più pesanti se la carica è +1) al rivelatore si dovrà deviare di più il loro percorso utilizzando un campo magnetico più grande.

Se si varia il campo magnetico, è possibile portare ogni flusso di ioni ad attivare il rivelatore, attraverso la produzione di una corrente proporzionale al numero di ioni che arrivano . La massa di ogni ione può essere rilevata perché in buona sostanza ciò è legato alla dimensione del campo magnetico utilizzato per portarlo al rivelatore . La macchina può essere calibrata per registrare corrente (che è una misura del numero di ioni) direttamente contro il rapporto m / z .

Analizzatore Quadrupolare (QMF = *Quadrupole Mass Filter*)

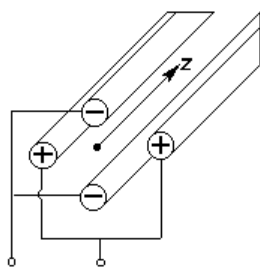
Negli strumenti con filtro di massa a quadrupolo, messi a punto da Paul e Raether nel 1955, sono impiegate quattro barre in acciaio o molibdeno di ca 20 cm di lunghezza cadauna. Alle barre opposte del quadrupolo è applicata una differenza di potenziale generata da una corrente continua ed alternata. Gli ioni entrano da un'estremità e viaggiano con velocità costante in direzione parallela ai poli (direzione z) ma acquistano, nel loro transito, delle oscillazioni complesse lungo le direzioni x e y a causa di questa applicazione contemporanea ai poli di una tensione a corrente continua (dc o *direct current*) e di una tensione a radiofrequenza (rf).

L'oscillazione stabile consente ad un particolare ione di attraversare da un'estremità all'altra il quadrupolo senza entrare in collisione con i poli; questa oscillazione dipende dal rapporto m/z dello ione, ovvero dal potenziale elettromagnetico oscillante. Perciò solo ioni con un preciso valore del rapporto m/z attraverseranno in certe condizioni l'intera lunghezza del filtro. Tutti gli altri acquisteranno oscillazioni instabili e collideranno con i poli, perdendosi. La scansione delle masse viene condotta variando nel tempo sia rf che dc , mantenendo però costante il loro rapporto.

Nel campo di potenziale quadrupolare, ovvero nel canale tra le aste, il potenziale stesso espresso in *volt*, è indipendente dalla profondità z ; in tal modo, la forza di Coulomb che agisce su una carica elettrica penetrata nel campo è praticamente nulla e si è soliti dire che **il filtro di massa quadrupolare è un analizzatore bidimensionale**, che funziona cioè, per le componenti F_x e F_y della forza colombiana F .

(Università della Tuscia, Viterbo, Dipartimento di Scienze Ambientali, Dottorato in ricerca di "Genetica e biologia cellulare", XVIII ciclo; "Proteomica come piattaforma di indagine dalle molteplici potenzialità applicative".

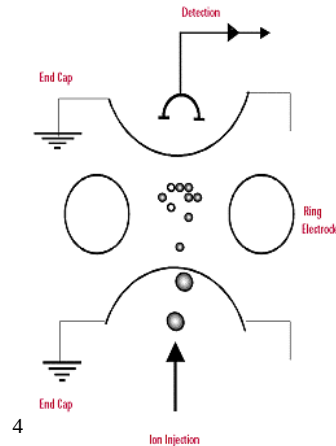
Coordinatore Prof. Luigi Bosco, Docente guida: Prof. Lelio Zolla, Dottorando: Corrado Ciambella., cap. 2, p. 33.)



Analizzatore a Trappola Ionica (IT)

In questi analizzatori le barre del filtro di massa presentano una disposizione sferica. Mentre quindi nel quadrupolo lineare gli ioni selezionati passano direttamente verso il rivelatore, la trappola di ioni trattiene temporaneamente, per un tempo desiderato, tutti gli ioni, che vengono rilasciati sequenzialmente verso il rivelatore variando il campo elettrico. Una piccola quantità di elio all'interno della trappola aiuta questo

processo diminuendo l'energia cinetica degli ioni e facendoli rimanere verso il centro della trappola e lontani dalle pareti. Oltre che “conservare” gli ioni, è possibile, aumentando progressivamente la radiofrequenza, rendere instabili le traiettorie degli ioni a rapporti m/z via via crescenti, che quindi escono dalla trappola e vanno a colpire il detector.



(<http://people.unica.it/michelabegala/files/2010/06/MS-Lezione-III-analizzatori.pdf>.)

In definitiva, la traiettoria circolare di una carica in un campo oscillante subisce un aumento di raggio quando la frequenza del campo uguaglia quella dello ione. Le trappole ioniche tuttavia non funzionano da filtro come il quadrupolo lineare.

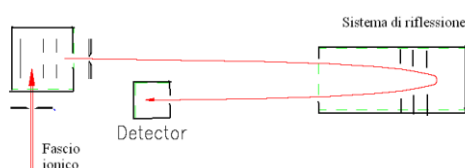
Analizzatore a Tempo di volo (Time of flight TOF)

Gli spettrometri di massa possiedono diversi metodi per determinare il rapporto massa/carica dello ione, e un metodo molto comune è il *tempo di volo* (**Time of flight**). Gli ioni provenienti dalla sorgente ionica sono accelerati da un potenziale (V) alla stessa **Energia cinetica**, quindi sono lasciati andare alla deriva lungo un tubo verso un rivelatore. Se si assume che tutti gli ioni che arrivano all'ingresso del tubo di volo possiedono la stessa energia, data da:

$$z e V = mv^2 / 2 = E_c, \text{ dove:}$$

V = potenziale applicato

z = il numero di cariche



(<http://people.unica.it/michelabegala/files/2010/06/MS-Lezione-III-analizzatori.pdf>. Fig. da <http://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id...> A.A.2012-13, 13.1, p. 8)

e = la carica dell'elettrone

m = la massa dello ione

v = la velocità dello ione,

allora ioni aventi masse diverse, *all'uscita da un campo elettrico* V , possiederanno differenti velocità *a seconda delle loro masse*:

$$v = (2 z e V / m)^{1/2}$$

Se uno spettrometro possiede **un tubo di volo di lunghezza L** , il *tempo di volo* (t) per un dato ione è dato da: $t = (L^2 m / 2 z e V)$.

(http://www.bioteconologiepertutti.it/?page_id=90.)

Infatti $t=L/v$. Questo analizzatore TOF lavora ad impulsi ed espelle gli ioni con un percorso **a Riflessione** (Reflector-top). (<http://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id...> A.A.2012-13, 13.1, p. 8.)

Spettrometria di Massa *Tandem*

La spettrometria di massa tandem (MS/MS) è tuttavia una metodologia che **interessa esclusivamente gli analizzatori** e impiega due o più stadi di analisi di massa per esaminare selettivamente le frammentazioni di una famiglia di ioni.

Generalmente tali frammentazioni sono indotte da collisioni con un gas (elio, azoto, argon, aria) che avvengono all'interno di una cella di collisione (*collision-induced dissociations*, CID), ma possono essere prodotte anche da interazioni con fotoni, elettroni, superfici. Il termine "tandem" si riferisce al numero di analizzatori, ma ci possono essere spettrometri di massa con tre, quattro o più analizzatori.

(http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:vnvaE2cqKJoJ:www.fedoa.unina.it/815/1/tesi_di_dottorato_tartaglione.pdf+&cd=1&hl=it&ct=clnk&gl=it)

Tutto ciò è vero per gli analizzatori **che separano gli ioni nello spazio**: ogni volta che si deve fare una separazione di massa si deve aggiungere un analizzatore e una cella di collisione.

Perciò, come abbiamo già considerato, sono necessari un sistema di analizzatori a doppio fuoco (analizzatore magnetico e analizzatore elettrostatico), o un triplo quadrupolo (brevemente **QqQ**), costituito da **un quadrupolo (Q1)**, una cella di collisione, che è un quadrupolo -che abbiamo già chiamato q2- a sola radiofrequenza, e un terzo quadrupolo (**Q3**); o ancora, un accoppiamento TOF-TOF, o sistemi ibridi, per esempio quadrupolo-TOF (QqTOF).

Nel caso di analizzatori che separano nel tempo, ne basta uno: ad esempio, una trappola ionica è sufficiente per poter effettuare esperimenti di spettrometria di massa tandem. Non solo, ma con un singolo analizzatore che separa gli ioni nel tempo è possibile effettuare separazioni di massa anche superiori a due (MSⁿ).

Uno spettrometro di massa tandem è costituito comunque da due analizzatori disposti in serie. **Il primo analizzatore (MS1) ha la funzione di selezionare (filtrare) tra i vari ioni presenti in uno spettro, lo ione desiderato.** Lo ione selezionato (ione “padre”, genitore o precursore) viene successivamente fatto collidere con un opportuno gas di collisione (He, Ar) in una cella di collisione, e i frammenti (ioni “figli” o prodotto), generati dalla dissociazione dello ione molecolare a causa degli urti con il gas di collisione introdotto nella camera, **vengono separati dal secondo analizzatore (MS2) in base al loro rapporto m/z .**

In questo modo si possono avere informazioni alle volte determinanti per la risoluzione di problemi strutturali. Strumenti dotati di sistema tandem MS sono **i tripli quadrupoli** (dove la frammentazione avviene secondo le modalità descritte) e **le trappole ioniche** in cui tutti e tre i suddetti eventi avvengono in un unico luogo, la trappola.

In realtà in questi due tipi diversi di analizzatori si esegue un esperimento spettrometrico Tandem con “progressione nello spazio o nel tempo”.

Progressione nello spazio significa che la selezione dello ione, la sua dissociazione indotta e l’analisi dei frammenti generati avvengono in spazi diversi (cioè in **diversi settori** dello spettrometro) come si verifica **nel triplo quadrupolo**.

Progressione nel tempo invece vuol dire che queste operazioni sono fatte nello **stesso spazio** (l’analizzatore a trappola ionica) ma **in tempi successivi**. Si isola lo ione desiderato (espellendo gli altri dalla trappola), per poi indurre la dissociazione dello ione isolato, e infine analizzare i frammenti generati all’interno della stessa trappola. Con un analizzatore a trappola ionica, si può inoltre pensare di isolare uno ione figlio e dissociarlo ulteriormente per studiarne la frammentazione. Si ottengono così ioni di seconda generazione che possono essere frammentati a loro volta. Il processo di frammentazione può essere ripetuto n volte e in questi casi si parla di MSⁿ.

Le informazioni in quegli studi di conferma servono per risolvere miscele complesse di prodotti di cui siano note le modalità di frammentazione.

Gli spettrometri tandem si dicono a geometria ibrida o non ibrida, a seconda che accoppiano due analizzatori diversi o meno.

Una delle configurazioni strumentali usate per la spettrometria di massa tandem è detta **Quadrupolo-Tempo di volo (QqTOF)**: *tra i due analizzatori si trova un quadrupolo che fa da camera di collisione*; e ancora la spettrometria ad estrazione liquido-liquido online accoppiata a spettrometria ad assorbimento atomico (AAS).

Si possono accoppiare:

- Quadrupolo accoppiato con TOF [tempo di volo] (**Q-TOF o Qq-TOF**)
- Magnetico/TOF
- TOF/TOF

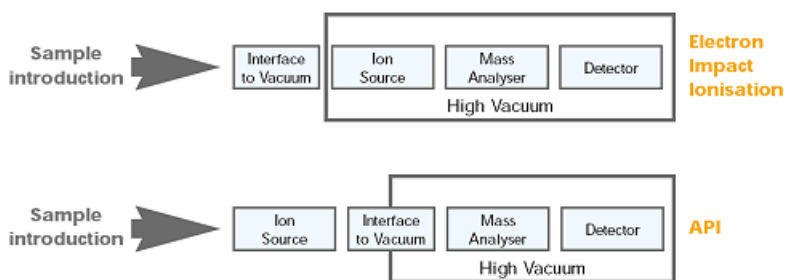
- Quadrupolo accoppiato con trappola ionica (**Q-trap**)

Interfacciamento LC-MS

*L'interfacciamento tra la **cromatografia liquida** e la **spettrometria di massa**, è un connubio particolarmente utile nella rivelazione sensibile di composti organici presenti in tracce in matrici complesse. Si sono infatti superate le cause dell'incompatibilità tra le due tecniche **HPLC** e Spettrometria di Massa (**MS**).*

HPLC	MS
<i>(può essere anche non distruttiva e facilita le analisi quantitative)</i>	
-Funziona in fase liquida ed è utilizzabile per campioni non volatili	-Funziona in fase gassosa
-Funziona a 25-50°C	-Funziona a 100-350°C
-Nessuna limitazione pratica di composti analizzabili	-Necessità di campioni con volatilità
-Nessuna limitazione pratica	-Peso molecolare limitato
-Utilizza tamponi inorganici	-Niente tamponi inorganici

Anche con uno strumento così complesso, l'HPCL è ancora utile per rimuovere le interferenze dal campione che andrà incontro alla ionizzazione. Strettamente correlate alla LC/MS sono alcune altre tecniche come ***l'Iniezione di flusso/MS***, la CE o ***CEC/MS***, la ***LC capillare*** o ***nano LC/MS***. In tutti i casi v'è la necessità di un interfacciamento che eliminerà il solvente e genererà ioni nella fase gassosa, trasferiti poi alle ottiche dello spettrometro di massa.



(<http://chemweb.ucc.ie/mass%20spec/MS%20summary.pdf>)

La maggior parte degli strumenti utilizzano la ionizzazione a pressione atmosferica in cui l'eliminazione del solvente e i vari livelli di ionizzazione sono combinati alla sorgente e si evidenziano a pressione atmosferica.

Pertanto la tecnica di ionizzazione più convincente per l'accoppiamento LC-MS, è rappresentata proprio dalla **Atmospheric Pressure Ionization (API)** dove la ionizzazione avviene a pressione atmosferica, introducendo poi gli ioni nel sistema ad alto vuoto dell'analizzatore di massa guidati da opportuni campi elettrici.

L'**ESI** è una delle molteplici varianti dell'API applicata tra l'uscita di un unità HPLC e l'ingresso di uno spettrometro di massa. Quando appunto si scegliesse la ESI la ionizzazione ad impatto elettronico, l'eliminazione del solvente e i vari gradi di ionizzazione sono separati. L'interfaccia è un particolare fascio di ioni, che separa il campione dal solvente e segue tosto alla introduzione del campione sotto forma di particelle secche nella regione ad alto vuoto.⁵ Nell'ESI classico la nebulizzazione avviene per semplice repulsione elettrostatica tra le particelle (goccioline) cariche producendo come abbiamo visto, uno spray molto allargato; si può osservare altresì, **l'Ion Spray Ionization (ISI)** in cui la nebulizzazione viene assistita da un nebulizzatore a gas (aria o azoto) che produce uno spray più direzionale, una maggiore compatibilità con acqua, nonché la possibilità di utilizzare flussi più elevati. Queste caratteristiche rendono particolarmente adatto l'**ISI** all'accoppiamento con l'HPLC. In ogni caso è spesso utile suddividere il flusso proveniente dall'HPLC prima del collegamento alla sorgente, al fine di ottenere un miglioramento del rapporto segnale/rumore, un recupero di parte del campione senza alterare la sensibilità in quanto l'ESI dipende dalla concentrazione dell'analita e non dalla sua quantità. Nella **TIS (Turbo Spray Ionization)** infine si può incrementare la velocità di evaporazione del solvente mediante **immissione controcorrente di un flusso di aria riscaldata** per operare come già osservato, a flussi di anche 1-5ml/min senza necessità di frazionare, suddividere un insieme di dati particolarmente grande ("splittare" da *to split*).

1.3.4 Modalità di acquisizione dei dati

Nella ifenazione di LC-MS le modalità di acquisizione dei dati possono essere:

Full Scan MS, *Product Ion Scan* (*MS/MS* o *MSⁿ*), *Selected Ion Monitoring* (SIM), *Selected Reaction Monitoring* (SRM), *Neutral Loss Scan* (NL), *Precursor Ion Scan* (PIS).

Nella modalità **Full Scan MS** l'analizzatore trasmette al detector tutte le masse e pertanto il cromatogramma deriva dalla corrente ionica totale (TIC), e non risulta selettiva in una miscela complessa. Considerando il tempo di sosta nell'analizzatore (*dwell time*) come abbiamo già accennato, si comprende come questa modalità sia poco idonea a rilevare le sostanze di cui si hanno solo tracce a disposizione.

Migliori risultati si ottengono usando l'analizzatore a trappola ionica che permette di trattenere in studio gli ioni interessati per un tempo modulabile a volontà. Gli ioni vengono segnalati come *Extracted ion chromatogram* (XIC).

Un cromatogramma **SIM** (**Selected Ion Monitoring**) assomiglia a quello XIC (detto anche EIC) e monitorizza solo gli ioni oggetto dell'indagine; ma a differenza di quest'ultimo, dove i segnali vengono estratti da una scansione completa, nel SIM vengono direttamente acquisiti solo i segnali di interesse. Ovvero solo quelli provenienti da ioni con particolare rapporto *m/z*. E' la tecnica più adatta a quantificare le sostanze in tracce che potrebbero sfuggire alle precedenti metodiche. Lo ione viene identificato quando il *dwell time* (tempo di sosta) è come quello dello standard puro e quando i picchi sono almeno 3 volte più evidenti di quello del rumore di fondo.

Un cromatogramma **Selected Reaction Monitoring** (SRM), monitoraggio di reazione selezionata, è un tipo di cromatogramma che si ottiene con spettrometri di massa tandem come rilevatori. Il cromatogramma riporta i segnali degli ioni prodotti da specifici ioni genitori. Dallo ione precursore si segue il processo fino allo ione frammento. Lo ione padre viene fatto collidere con gas azoto o argon nel secondo analizzatore per ottenere gli ioni figlio, ovvero il prodotto che si accumula nel terzo analizzatore. Anche questa metodica come la SIM permette di recepire le sostanze appena in tracce, poiché la sensibilità in *Full Scan MS/MS* è maggiore.

(http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:vnvaE2cqKJoJ:www.fedoa.unina.it/815/1/tesi_di_dottorato_tartaglione.pdf+&cd=1&hl=it&ct=clnk&gl=it , pp. 17-21.)

La **MRM** (**Multiple Reaction Monitoring**) è l'applicazione della SRM (*Selected Reaction Monitoring*) agli ioni prodotti da uno o più ioni precursori.

Nella **PIS** (**Precursor Ion Scan**, *MS/MS* o *MSⁿ*) si seleziona un determinato ione avente un certo rapporto *m/z* (*ione precursore*). Nel quadrupolo, la massa selezionata trasmessa da Q1 collide in Q2 (vedi descrizione della cella di collisione [q2]) con il gas azoto generando gli ioni prodotto. Il lavoro è terminato dalla separazione degli ioni da parte di Q3 che opera nella modalità *Full Scan MS* con risultato di uno spettro di frammentazione. E' assai adatta alla distinzione tra composti che abbiano una parte della loro struttura molecolare identica, ovvero condividano un tratto o frammento comune.

Nella **Neutral Loss Scan (NL)** il triplo quadrupolo lavora in regime *Full Scan* ma la scansione in Q1 e Q3 è differente per la diversa perdita neutra, peraltro calcolata a distinzione anche qui tra sostanze che abbiano qualche gruppo funzionale comune. La NL segue in altre parole gli ioni che per frammentazione perdono un certo frammento neutrale ai fini del riconoscimento della sostanza ma finisce per distinguerlo da un frammento a valenza diagnostica.

(<http://clas.ucdenver.edu/sasl/Instrumentation/Organic/LCMS/LC%20Training/05%20Quadrupole%20Scan%20Modes.pdf> , 5.3, p. 7.)

Schema generale del comune utilizzo della MS a seconda delle sostanze

Caratteristiche delle sostanze

	Sistemi di ionizzazione	Accoppiamenti possibili
<i>Volatili</i>	EI	GC/MS
<i>poco polari</i>	EI CI	GC/MS
<i>polari</i>	EI CI	GC/MS (derivati)
<i>molto polari</i>	DCI APCI FI (FD) TSP	GC/MS derivati LC/MS
<i>estremamente polari</i>	DCI (APCI) FD FAB ESI	LC/MS

EI = Electron ionisation – impact

ESI = Electrospray Ionisation

CI = Chemical ionisation

APCI = Atmospheric Pressure Chemical Ionisation

DCI = Desorption chemical ionisation

FI = field ionisation

FD = field desorption o desassorbimento di campo

TSP = Thermal Separation Probe (tecnica di velocizzazione delle analisi)

FAB = Fast Atom Bombardment

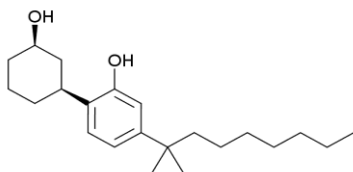
1.3.5 Effetti di vecchie e nuove droghe

Nuove sostanze usate come stupefacenti, vengono col tempo all'osservazione dei servizi di analisi nei gabinetti deputati al monitoraggio. Il cammino per un parziale contenimento del fenomeno delle sostanze d'abuso, è ancora assai lungo, dal momento che le cause che l'inducono hanno radici nei problemi esistenziali, i quali d'altronde molto di rado sono suscettibili di rapide risoluzioni.

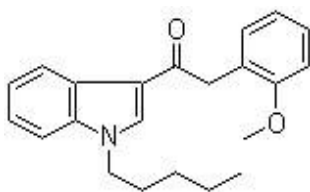
Sono soprattutto gli analoghi del THC (tetra-idro-cannabinolo) contenuto nella marijuana a destare l'interesse. (http://en.wikipedia.org/wiki/AM-1221#cite_ref-3. Vedi anche: Manera, C, Tuccinardi, T; Martinelli, A (2008). Il **JWH-250** è stato scoperto dal ricercatore Dr. **John W. Huffman** (estate 1995). Creò il JWH-250 e una serie di altri composti per ricercare la struttura e la funzione del sistema degli endo-cannabinoidi nei mammiferi. I campioni di JWH-250 sono stati identificati nel maggio 2009 dalla Polizia giudiziaria federale tedesca, come ingrediente di nuova generazione nelle "miscele di fumo a base di erbe", che erano stati pubblicati dopo la messa al bando degli ingredienti originali (C8)-CP 47497 e JWH-018 .

Il **CP 47497*** è un cannabinoido agonista del recettore, sviluppato per la prima volta Pfizer nel 1980. Ha effetti analgesici e viene utilizzato nella ricerca scientifica. Esso è un potente agonista CB₁ con K_d di 2.1nM. L'uso non autorizzato di questi composti in miscele di fumo a base di erbe ha portato ad un ritorno di ricerche scientifiche legittime nel loro uso, e di conseguenza l'omologo C8 di CP 47497 è stato assegnato un nome proprio, **cannabi-cicloesano**lo .

Ma fino al marzo 2011, questi composti attivi, (JWH-018, JWH-073, CP-47497, JWH-200, JWH 250 e il cannabi-cicloesanolo), risultavano dichiarati illegali negli USA.



*CP-474972-[(1R,3S)-3-idrossicicloesil]-5-(2-metiloctan-2-yl)fenolo



**JWH-250 2-(2-Metossifenil)-1-(1-pentil-1H-indol-3-yl)etanone

E' presumibile che nel futuro queste molecole risulteranno di notevole interesse per i laboratori deputati a rilevare le tracce delle sostanze d'abuso per motivi clinici e/o forensi.

Nel frattempo, molte altre sostanze di origine naturale o sintetica giungono all'attenzione dei laboratori ai fini di polizia sanitaria. (http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_3146_listaFile_itemName_17_file.pdf): tra quelle di **origine naturale** annoveriamo gli Stramoni e il floripondio, i catinoni, l'ayahuaska, la *Salvia divinorum*, e il Guaranà. E ancora, i funghi allucinogeni, la psilocibina, che come l'LSD rientra nelle triptamine. Tra le fenetilamine ricordiamo l'ecstasy, la metamfetamina, e la mescalina.

Le **molecole sintetiche** attualmente monitorizzate nell'ambito UE sono le seguenti:

Bromo-Dragonfly o bromo-benzo-difuranil-isoprophylamina

DOI 4-iodo-2,5 dimetossianfetamina

TFMPP trifluorometilfenil-piperazina

Kratom. *Mitragina speciosa*, o mitraginina

Benzilpiperidina

Crocodile

Benzidamina

Mefedrone, Metilone, Butilone, Bufedrone

MDNA Metilen-diossi-metil-anfetamina

BMC Benzil-metil-chetone

MDE(A) Metilen-diossi-fenil-anfetamina

MBDB Metilen-diossi-fenil-butamina

GHB gamma-idrossi-butilirrola

GBL gamma-butilirrola-lattone

DOB Dimetossi-bromo-anfetamina

2-CB Bromo-dimetossi-fenetil-amina (nexus)

Etil-catinone

DBZP 1,4 benzil-piperazina

2,4 DMA Dimetossi-alfa-metil-benzene-etanamina

Alla radice dell'assunzione di sostanze d'abuso e della difficoltà del trattamento della tossicodipendenza in genere, stanno motivazioni esistenziali, etiche e sociali che qui non possiamo indagare, ma sembra giusto far notare che l'odierna biomedicina ha posto in evidenza i legami -che si possono accertare- tra la dipendenza da farmaci psicoattivi e il danno sulla neuroplasticità del nostro sistema nervoso centrale, specie nelle aree che mostrano una gerarchia adattativa di comportamenti essenziali per la sopravvivenza della specie. In altre parole i soggetti che assumono droghe o sostanze d'abuso hanno scarsa capacità di sottrarsi alle ricadute dopo trattamenti o interruzioni, e non mostrano tendenza ad accontentarsi delle comuni vie di gratificazione naturale come il cibo, il sesso etc. Infatti, alcuni neuroni della corteccia prefrontale subiscono alterazioni elettrofisiologiche per l'esposizione cronica a determinate sostanze. Le neuroscienze hanno dimostrato che gli effetti di questa aggressione farmacologica ha su alcune aree corticali lo stesso effetto di un grave trauma. In particolare si intende parlare della corteccia orbito frontale (Volkow ND, Fowler JS, 2000) e di quella prefrontale nell'area ventro-mediale (Damasio Antonio Rosa, 1995) deputate ambedue a presiedere a quello che si può genericamente definire come comportamento umano responsabile e partecipato.

Si giunge pertanto alla perdita delle inibizioni corticali sulle azioni che si compiono con l'uso di un insolito turpiloquio e un eccesso di aggressività e nuova tendenza al consumo eccessivo di alcol, di tabacco e di droghe. Se ciò avviene poi in una giovane donna in stato di gravidanza, e se ci sono situazioni di stress e

disagio materno e/o familiare, si verifica una produzione in eccesso di neuro-ormoni che svolgono funzioni di regolazione sul S.N.C. Ne deriva un'influenza dannosa nella sinaptogenesi ma di conseguenza, sul comportamento, sul temperamento e sulla salute psico-fisica in generale: si forma un essere con disposizioni negative di base. Se la situazione di disagio riguarda l'ambiente familiare e sociale, si forma un "Io" rarefatto e debole, che introietta una immagine negativa della realtà: nasce il dolore psichico.

Ora è ben noto che il dolore è una spiacevole esperienza sensoriale ed emotiva associata a danno tissutale reale o potenziale.

La percezione del dolore è una qualità inerente alla vita, non richiede esperienza anteriore, e nel neonato si esprimerà con manifestazioni comportamentali, neurovegetative (tachicardia, tachipnea, sudore palmare), manifestazioni ormonali e metaboliche: catecolamine, glucagone, cortisolo, aldosterone, Gonadotropine umane, β -endorfine.

Ne risulta iperglicemia, iperlattacidemia, iperchetonemia, e dalla persistenza degli stimoli, provengono eccitazione neuronale e turbe comportamentali.

Si instaura una tendenza a perpetuare i meccanismi del dolore e dello stress: attraverso una sottoclasse di canali ionici cellulari regolati dal glutammato, chiamati canali recettori dell'NMDA [N-metil-D-aspartato], altamente permeabili al Ca^{++} , e legati ai cambiamenti a lungo termine delle sinapsi neuronali, cioè legate all'apprendimento e alla memoria.

Nell'organizzazione del S.N.C. l'influsso cade perciò non solo sullo sviluppo comportamentale ma anche sulle abilità cognitive e sull'apprendimento, strettamente connesse con il benessere personale. Il danno eccitotossico porta all'apoptosi cellulare, ma anche all'alterazione della struttura della funzione recettoriale.

Come conseguenza poi, nello *sviluppo cerebrale successivo* c'è *diminuita sensibilità al dolore* per abuso recettoriale e aumentata esplorazione del mondo fatta con disordine, deficit dell'attenzione, ipereccitabilità ed impulsività.

Ma anche disturbi cognitivi, scarse capacità di socializzazione, e preferenza per specifiche sostanze (preludio alla dipendenza da alcune di esse).

All'inizio la vita è caratterizzata da una indifferenziazione tra funzioni somatiche e funzioni psichiche; ma mentre per quelle biologiche, le fasi precedenti del processo ontogenetico non sono conservate, per quelle psichiche, è tutto il contrario. Soltanto nel mondo psichico si conservano tutte le tappe evolutive accanto alla strutturazione finale (Freud). Proprio per la natura della memoria, un conflitto radicato nello stadio proto-mentale può esprimersi sia nella somatizzazione, che nello psichismo, come pure con un comportamento antisociale.

Esiste ad esempio un sistema di valore che rilascia il neurotrasmettitore *dopamina*. Questo sistema si trova nei gangli della base e nel tronco encefalico. Il rilascio di dopamina agisce come un sistema di ricompensa che facilita l'apprendimento, tramite l'incasellamento mnesico mediato dal *glutammato* e dall'NMD *aspartato*.

Altri sistemi rilasciano neurotrasmettitori differenti; quelli che rilasciano *serotonina* governano *l'umore* e quelli che rilasciano *acetilcolina* possono *modificare le soglie nello stato di veglia e nel sonno*. (vedi anche *adrenalina* e *nor-adrenalina*). I sistemi di valore forniscono le propensioni e le ricompense"(G. Edelman

2007). Una turba del delicato equilibrio tra i mediatori neurotrasmettitori come accade nei tossicodipendenti, stravolge il normale meccanismo di ragionamento empatico basato su una equilibrata emotività, base dei rapporti interpersonali.

2. *Scopo del Dottorato*

Compito del Laboratorio di Tossicologia Forense è generalmente la produzione di un dato che accerti la presenza o assenza di sostanze esogene nel campione biologico.

Tuttavia il Laboratorio non fornisce esclusivamente un risultato analitico, ma l'emissione del dato è condizionata da una serie di valutazioni chimico-tossicologiche che possono essere effettuate soltanto da chi ha esperienza e bagaglio culturale idoneo. Quello che viene richiesto al Tossicologo Forense è infatti l'interpretazione del dato analitico ottenuto; l'interpretazione riguarda il significato della positività o negatività in relazione ad una serie di parametri quali ad esempio la tipologia del campione biologico esaminato e le tecniche analitiche utilizzate. E' necessario inoltre considerare eventuali prescrizioni farmacologiche, la tipologia dell'assunzione (occasionale o cronica, recente o pregressa), eventuali adulterazioni o contaminazioni volontarie o accidentali del campione. La fase dell'interpretazione del dato deve tener presenti anche i parametri analitici riguardanti la specificità e la sensibilità del test impiegato.

Il risultato ottenuto non ha solo una ricaduta nella diagnosi e terapia, come per altre analisi di laboratorio, ma può condurre a decisioni amministrative e legali in contesti diversi. Negli ultimi anni a causa soprattutto della grande espansione dei problemi legati all'assunzione di sostanze stupefacenti, è aumentata la richiesta di risposte analitiche in ambito tossicologico e l'esigenza di maggiore affidabilità del dato. I cambiamenti nel panorama dell'abuso di sostanze stupefacenti rendono necessari programmi di controllo e di collaborazione con altri laboratori al fine di aggiornare e ottimizzare continuamente le procedure analitiche.

Le nuove metodologie e apparecchiature consentono livelli di risoluzione delle concentrazioni delle sostanze molto alti che necessitano però di validazione per poter essere utilizzati a livello diagnostico e legale. Per questo si è ritenuto opportuno eseguire tale progetto, al fine di rendere ulteriore contributo alla validità delle metodiche di laboratorio.

3. Materiali e Metodi

Strumentazione

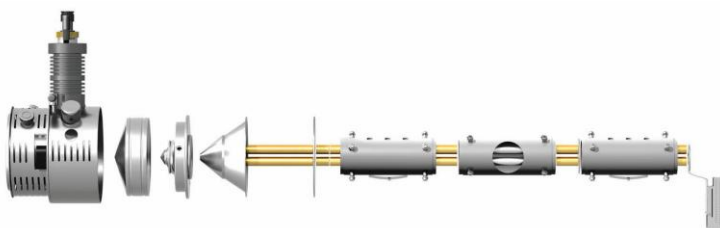
Presso il nostro servizio di Tossicologia le analisi in **HPLC-ESI-MS/MS** sono effettuate attraverso un sistema **UHPLC UltiMate 3000 di DIONEX** con controllo remoto (via software di gestione strumentale o proprio comando manuale), equipaggiato di auto campionatore termostato e modulo per l'alloggiamento della colonna analitica egualmente termostato. Il sistema UltiMate 3000 HPLC offre la compatibilità UHPLC su tutti i moduli, assicurando massime prestazioni per tutti gli utenti e tutti i laboratori. Coprendo flussi da 20 nL/min a 10 mL/min e proponendo

un'ampia gamma di pompe, campionatori e rivelatori, la serie UltiMate 3000 offre soluzioni per ogni esigenza in ambito cromatografico, in quanto vi si può adattare ogni tipo di colonna.

Il sistema HPLC è stato interfacciato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 3200 Q TRAP, fornito di sorgente ionica ESI.

Lo spettrometro di massa è dotato di una pompa per infusione aggiunta per condurre esperimenti in regime di **FIA (Flow Injection Analysis)**. In detto regime l'analita è iniettato nel flusso del solvente; si ottiene una più elevata velocità di flusso, facilmente > 1ml/min. Si nota meglio la differenza tra il segnale e il rumore di fondo, ottimizzando i parametri della sorgente ionica.

... L'accoppiamento LC-MS/MS, "è *"uno strumento indispensabile" nelle analisi tossicologiche*
... *È in grado di analizzare la droga tra diverse classi di composti in un unico passaggio*
... *È in grado di eseguire sia controlli qualitativi e quantitativi conferme*
... *In grado di adattarsi rapidamente alle analisi di nuovi farmaci come diventano di interesse*
... *Può ridurre tempo e costi necessari per le analisi tossicologiche*
... *È diventato abbastanza semplice per analisi di routine"*



(http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/mass-spectrometry-cms_041968.pdf.)

The API 3200™ LC/MS/MS system

Il sistema API 3200 Small Benchtop a disposizione, aumenta il potere e il rendimento della Spettrometria di Massa mediante la presenza del triplo quadrupolo. Esso permette di trasferire ioni, distinguere e scegliere gli

ioni in base al rapporto massa/carica (m/z), filtrare gli ioni con specifico rapporto massa/carica (m/z). Gli analizzatori a quadrupolo operano con modalità di ampiezza di picco costante (il picco resta della stessa ampiezza oltre un *range* di massa selezionato). Lavora tramite risoluzione all'unità, con set automaticamente sintonizzato in alto o in basso. L'operatore può scegliere una risoluzione più alta in base ai problemi da risolvere (ad es. fissando la risoluzione singolarmente caricata a 0.5-0,6 **uma** o **amu** o *atomic mass unit* (unità di massa atomica) completamente sintonizzato con metà del peso molecolare, può aiutare nella ricerca di ioni a doppia carica. La bassa risoluzione specialmente in Q3, spesso migliora la sensibilità nella **MRM (Multiple Reaction Monitoring)**, modalità usata per l'analisi quantitativa. La MRM è come ricordato, l'applicazione della SRM (*Selected Reaction Monitoring*) agli ioni prodotti da uno o più ioni precursori.

E' sempre raccomandato calibrare l'asse di Massa dopo la risoluzione scelta per aggiustarvi il quadrupolo.

La fonte di gas azoto è fornita da un sistema generatore ed è usato come *curtain gas*.

Nel sistema **UHPLC ultimate 3000 di DIONEX**

la separazione è stata ottenuta utilizzando una **colonna cromatografica** analitica *Kinetex Phenomenex 2.6U XB- C18 100 A* (100 x 2,10 mm), preceduta da una **precolonna** *Phenomenex STRATA-X CW 25 micron on line Extraction 20*2 mm*.

In generale (3200 QTRAP® LC/MS/MS System, *Hardware Guide*, D1000092202C, Release Date: July 2011. pp. 6-9.) **il sistema 3200 QTRAP® LC/MS/MS** include uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo ibridato / LIT (*linear ion trap*), una sorgente ionica, che è la ESI nel nostro caso, un computer e un *software per Analista*.

Le applicazioni per il sistema si elencano di seguito:

- Analisi Quantitativa di piccole molecole
- Analisi Qualitativa di piccole molecole
- Analisi Qualitativa di proteine e peptidi

Quantitativa

Questa applicazione consente la misurazione di composti a specifico peso molecolare, come un farmaco o una sostanza d'abuso o un suo metabolita in un campione liquido con i frammenti ionici derivati, al fine di determinare l'esatta quantità del composto nel campione d'interesse. L'analisi quantitativa è eseguita usando una curva standard ad intensità di segnale ottenuto sullo spettrometro di massa, per varie concentrazioni note del composto. Il segnale ottenuto nel campione del test è poi comparato alla curva standard per determinarne la concentrazione.

Qualitativa

Il peculiare tipo di scansione in uso per queste applicazioni nel sistema 3200 QTRAP è uno scan potenziato **EMS (Enhanced Mass Spectrometry)** per l'analisi di pesi molecolari intatti. Per ulteriori analisi strutturali dettagliate, usando la MS Tandem, si possono eseguire scan **EPI (Enhanced Product Ion)** ed **MS3**

(MS/MS/MS). Inoltre, il sistema può combinare le modalità a triplo quadrupolo e quella **LIT** (*linear ion trap*) per ottenere in una singola corsa LC ambedue le analisi, quantitativa e qualitativa.

Con il sistema in dotazione 3200 QTRAP si possono usare **tutti i tipi di sorgenti ioniche** provando diverse combinazioni al fine di produrre ioni da campioni liquidi.

Sulla modalità Quadrupolo

La serie di filtri quadrupolari trasmettono gli ioni secondo il loro rapporto massa/carica (m/z). Gli ioni all'inizio del percorso vengono focalizzati da Q0 prima di passare in Q1. Questo Q1 è un quadrupolo filtrante che classifica gli ioni prima della loro entrata in Q2 (q_2), una cella di collisione LINAC (Gli acceleratori lineari di particelle LINAC (o linac), da lin(ear) ac(celerator)) sono strutture in grado di accelerare particelle cariche (protoni, elettroni, positroni, ioni pesanti, etc.), *perché quelle neutre non possono essere accelerate.*) in cui gli ioni possono essere frammentati per la collisione con le molecole del gas. Si determina così la composizione degli ioni genitori. Dopo il passaggio attraverso Q2, gli ioni entrano in Q3 per un filtraggio aggiuntivo, e infine entrano nel *detector*. Qui gli ioni creano una corrente che è convertita in un impulso di tensione. Detti impulsi che lasciano il detector, sono direttamente proporzionali alla quantità di ioni che vi entra.

I *monitors* dello strumento avvertendo questi impulsi di tensione, convertono l'informazione in segnale, e questi segnali rappresentano l'intensità ionica per un particolare rapporto m/z . Così, sul display dello strumento appare questa formazione come uno spettro di massa. E' questa la modalità in uso presso il nostro laboratorio.

Essa ha il vantaggio che il Q2 LINAC, come accennato elimina la dissonanza per interferenza diafonica dovuta al *rumore di fondo* e permette uno scanning MS tandem senza perdita di sensibilità. Infatti il CEM Detector (**Channel Electron Multiplier**) in dotazione è esente da rumore parassita, mentre il semplice detector analogico filtrerebbe solo il segnale impostando una soglia per la lettura dello stesso, più alta. La filtrazione del segnale grezzo tipica del detector analogico (ADC) è infatti il modo più in voga per ridurre il cosiddetto rumore di fondo. Ma sfortunatamente non è in grado di registrare gli impulsi mono-ionici che sono in genere i più bassi. (vedi Triplo Quadrupolo e Q2 LINAC, p. 53). Altrimenti detto, nel CEM Detector, il segnale generato da un rivelatore consiste una serie di impulsi elettrici, ognuno dei quali rappresenta l'impatto di uno ione, sicché vengono rilevati anche gli impulsi derivanti da bassissimi segnali.

Sulla modalità LIT (*Linear Ion Trap*)

Un fattore comune in codeste modalità potenziate del 3200 QTRAP sta nel fatto che gli ioni sono intrappolati nella regione quadrupolare Q3 e poi analizzati fuori per produrre uno spettro completo di dati. Confrontando questi dati con quelli prodotti nella modalità quadrupolare standard, questi ultimi sono significativamente

meno intensi di quelli in LIT. Il quadrupolo Q3 opera in questo caso solo col voltaggio principale a RF. In tal modo si previene il passaggio degli ioni tra le bacchette del quadrupolo Q3, e vengono anzi forzati a tornare indietro, riflessi da una lente cui si applica una corrente continua DC (*direct current*) che fa da barriera. Trascorso tutto il tempo necessario alla dinamica (*fill time*) la corrente continua DC è applicata alla lente d'entrata in Q3. Si applica ora in Q3 una frequenza ausiliaria di corrente alternata (AC). Quando gli ioni vengono frammentati in risonanza con la frequenza AC acquisiscono sufficiente velocità assiale per superare la barriera alla lente d'uscita e sono assialmente gettati verso il detector ionico dello spettrometro di massa. Lo spettro completo dei dati può essere acquisito dagli ioni raccolti in Q3, analizzando rapidamente il principale voltaggio a RF.

Sorgente Ionica: ESI

Alcune tecniche, come già visto, consentono di analizzare solo ioni positivi; altre invece, permettono la rivelazione anche di ioni negativi. In questo laboratorio la modalità utilizzata opera analizzando gli ioni positivi.

Nel processo di ionizzazione per desorbimento la molecola in esame viene sia evaporata che ionizzata da una matrice, con la formazione di ioni molecolari positivi M^+ . e pseudo-molecolari $[M+H]^+$. Negli esperimenti MS/MS eseguiti, uno ione avente un determinato rapporto m/z (ione precursore) può essere selezionato tra quelli formati in sorgente, o presente tra quelli contenuti in una trappola ionica.

Lo ione precursore viene quindi frammentato mediante collisioni a bassa energia.

Gli ioni frammento così generati vengono infine analizzati in un secondo *step* di analisi di massa

(http://www.masterms.it/e107_files/public/2-Gli%20Approcci%20Proteomici.pdf).

Il metodo deve presentare:

- Specificità : la metodica deve essere in grado di identificare univocamente la presenza di una sostanza nel campione analizzato e di distinguerla da sostanze aventi struttura simile. (MS/MS, MRM ratio).
- LOD e LOQ stabilita la sensibilità del metodo, ovvero la concentrazione alla quale, in tutte le condizioni strumentali, il metodo è sempre in grado di identificare la sostanza in esame secondo i criteri stabiliti.
- Ripetibilità
- Precisione ed accuratezza
- Linearità: per le sostanze per cui è previsto un cut-off deve essere valutata la linearità del metodo almeno nel range che va tra la metà ed il doppio di tale valore.
- Trascinamenti (*Carryover*): deve essere dimostrata l'assenza di trascinamenti di analiti da un campione al successivo.

Perché si usa diluire prima di far iniziare la seduta? La diluizione è un fatto fondamentale. **Col sistema bidimensionale on-line in uso** si può diluire in SPE, e avviare concentrando i campioni di set-up con una sola valvola.

(Da SPE ON-LINE LC/MS/MS for tox-forensic application, AB Applied Biosystems, MDS Analytical Technologies. ©2010)

Classe di sostanza	Concentrazione urine (cut-off)
OPPIACEI METABOLITI (morfina, codeina, 6-acetilmorfina)	100 ng/ml
COCAINA E METABOLITI	100 ng/ml
CANNABINOIDI METAB.	15 ng/ml
METADONE	100 ng/ml
AMFETAMINE ED ANALOGHI	
Amfetamina	250 ng/ml
Metamfetamina	250 ng/ml
MDMA-MDA-MDEA	250 ng/ml
BUPRENORFINA	5 ng/ml

Soluzioni e Standard utilizzati

Partendo dagli standard chimici e dagli analoghi deuterati (standard interni), a diversa concentrazione degli analiti in studio, si approntano delle soluzioni in **Fase Mobile**.

- **Fase Mobile di *Loading*** (caricamento della precolonna)
 - 850 ml di H₂O
 - 150 ml di metanolo
 - 2 ml di ammonio acetato 1 M (2mM) (NH₄-COOCH₃).
- **Fase Mobile per cromatografia**
 - (A) = H₂O + 0,5 % di acido formico (400 ml di H₂O + 2 ml di ac. formico)

-(B) = Acetonitrile + 0,5 % di acido formico.

Tale procedimento di preparazione della fase mobile permette l'ottimizzazione dei successivi dati, integrati con l'ifonazione. Ciò facilita la continua modulazione dei gradienti cromatografici nell'**approntamento della precolonna** e della intera sessione analitica del batch. E' nella fase di *Loading* che avviene la solvatazione (vedi).

Il campione viene iniettato nella **precolonna** e nella **colonna** analitica collegate in serie. Dopo la commutazione della valvola, il flusso nella colonna analitica continua nella direzione normale. Il lavaggio in controcorrente interessa esclusivamente la precolonna; i picchi a forte ritenzione vengono eluiti direttamente nel rivelatore. Anche per questo si parla di **analisi bidimensionale**.

Non dissimilmente si prepareranno gli standard per le curve di calibrazione analitica e dei livelli QC (*quality control*) su matrice urinaria che è quella in precipuo uso corrente.

Trattamento degli standard della matrice urinaria

Iniziamo aggiungendo a 1 ml di urina 30 µL delle soluzioni metanoliche di partenza, precedentemente descritte, degli analiti, e 30 µL delle soluzioni di standard interni.

I campioni urinari di morfina sono stati addizionati con aceto nitrile. Mediante la reazione di idrolisi così descritta è stato possibile staccare l'analita dal composto.

Estrazione degli analiti dalla matrice

Si descrive di seguito la procedura analitica adottata sugli standard e relativi deuterati:

Il campione di urina viene sottoposto ad **un'idrolisi** prelevandone 500 µL con l'aggiunta successiva di tampone di ammonio acetato (pH 4-5) + 10 µL di β-glucuronidasi.

L'estratto di matrice viene incubato per un'ora a 55°, e poi se ne trasferiscono 200 µL in una *vial* (fiala o ampolla) arricchita con 800 µL di *loading*. Le *vials* contenenti le varie concentrazioni di standard per ottenere le curve di calibrazione, sono inserite nel piatto del cromatografo in cui un iniettore (dotato di auto campionatore per l'analisi automatica) provvederà in regime di controllo della temperatura della colonna, al trasferimento dell'effluente dalla colonna stessa all'interno dello spettrometro di massa.

Soluzioni a titolo noto: metanoliche e in matrice

Le soluzioni metanoliche fornite dalle ditte, sono in genere a concentrazione di 1mg/ml. I liquidi consigliati per un uso in sicurezza dello strumento in dotazione, come abbiamo fatto cenno, sono:

Il metanolo (da 0 a 100%), **l'Aceto nitrile** (da 0 a 100%), **l'acqua, l'Ac. Formico** (da 0 a 1%), **l'Acetato di Ammonio** (da 0 a 1%). (3200 QTRAP® LC/MS/MS System, Hardware Guide, D1000092202C, Release Date: July 2011. p 16) . Le soluzioni metanoliche standard a titolo noto degli analiti e degli standard interni sono state diluite separatamente in modo da ottenere soluzioni madre di concentrazione 500 ng/μL.

Le soluzioni sono state ulteriormente diluite per ottenere soluzioni di lavoro a concentrazione decrescente ma in modo diverso per i diversi analiti.

La preparazione dei campioni urinari delle soluzioni metanoliche delle sostanze d'abuso considerate, ha previsto diluizioni successive partendo dalla soluzione madre di 500 ng/μL e ottenendo concentrazioni utili di 300, 150, 75, 30, ng/μL. Per ogni analita, si approntano così, campioni con concentrazioni situate nel range di linearità. Allo stesso modo sono state ottenute soluzioni a titolo noto e costante di standard interni.

Il sistema MultiQuant [MQ4]

In sistema MQ4 in uso riesce a determinare i vari elementi fino a concentrazioni inferiori ad una parte per miliardo o PPB (*below one part for billion*).

Sicché il percorso del *Drug Screening Validation* si svolge secondo i seguenti gradini:

Con 0 parti per miliardo su 0PPB

1) urina normale + standard

2) 1: 10 con loading

Con PPB Non Estratto

Urine loading + standard alle concentrazioni attuali di 10 (10 PPB), 30 (30PPB), 75 (75PPB), 150 (150PPB), 300 (300PPB).

Segue per ciascun analita un *PPB replication* con urine loading + standard + estrazione.

Il procedimento è stato applicato alle sostanze considerate e abbiamo registrato :

-Le analisi qualitative per le seguenti sostanze :

6-Acetil morfina, Codeina, Morfina, Benzoilecgonina, THC-COOH, THC-COOH D9, Metadone.

-Le analisi quantitative per le seguenti sostanze:

Anfetamina, Benzoilecgonina, Cocaina, Codeina, THC-COOH, EDDP, MDA, MDMA, Metadone, Metanfetamina, Morfina, Norbuprenorfina, LSD.

Analisi UHPLC-MS/MS (Spettrometria di Massa Tandem).

Sia la fase di acquisizione dei dati che l'analisi successiva sono assistite dal software, che consente al computer di controllare componenti quali l'autocampionatore, il programma di temperatura del cromatografo, la sorgente di ioni fino all'automatizzazione completa dell'intero sistema, dall'iniezione del campione, alla calibrazione, all'analisi dei dati fino alla stesura di un rapporto finale.

E' importante sottolineare che gli analiti sono considerati secondo le differenti classi chimiche, caratterizzate da differenti funzionalità e proprietà che influiscono largamente sulla scelta dell'estrazione e delle condizioni cromatografiche.

L'intera **procedura on line SPE UHPLC-MS/MS** viene applicata ai campioni dei singoli standard in urina precedentemente idrolizzati e a campioni di mix contenenti gli analiti considerati a diverse concentrazioni.

Richiamo qui che nella HPLC in **fase normale** la Fase stazionaria è polare (Es. nitrile), mentre la Fase mobile è un solvente apolare (Es. esano). E' chiaro che in **fase inversa**, la Fase stazionaria- è apolare (Es. octasilano o C18) e la Fase mobile è un solvente polare (acqua/acetonitrile, acqua/metanolo).

L'Analisi bidimensionale nell'Analizzatore di massa a quadrupolo

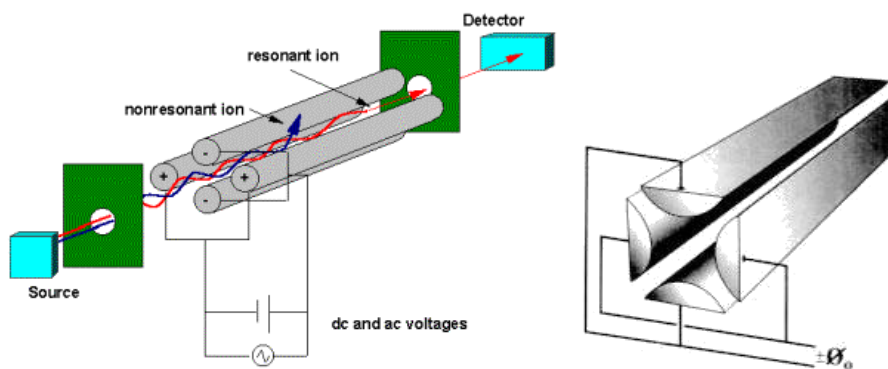
Nell'analisi di una miscela di analiti in proteomica, questi vengono separati in funzione del loro **punto isoelettrico** e della loro **massa molecolare**. Si parla di *elettroforesi bidimensionale (2-DE)* o gel bidimensionale. (Vedi cenno nella trattazione MALDI, SELDI). Si parla di analisi bidimensionale anche nella UHPLC considerando l'eluizione in fase di loading (caricamento della precolonna) e quella in fase cromatografica vera e propria. (Vedi Soluzioni e Standard utilizzati, pp. 86-87).

Ma, nell'Analizzatore di massa a quadrupolo (QMF= **Quadrupole Mass Filter**) come nel nostro caso, le caratteristiche importanti per tutte le sostanze da identificare sono tre: la velocità di scansione, l'intervallo di masse analizzabili (*mass range*), e la minima quantità rilevabile (MDQ= *Minimum Detectable Quantity*), detta impropriamente *sensibilità*.

Nondimeno, nel campo di potenziale quadrupolare, **si compie pure una analisi bidimensionale** perché la forza colombiana F agente sulla carica elettrica nel punto delle coordinate x ed y in un dato tempo, mentre uno ione avanza con velocità uniforme tra le quattro aste del quadrupolo in direzione z , è costituita **solo dalle due componenti F_x ed F_y** ; si può dimostrare che il potenziale nel canale tra le aste è indipendente dalla profondità z ; in tal modo, la forza di Coulomb che agisce su una carica elettrica penetrata nel campo è praticamente nulla e pertanto si è soliti dire anche in questo senso, che **il filtro di massa quadrupolare è un analizzatore bidimensionale**. In altri termini, le oscillazioni di alta frequenza, delle componenti F_x e F_y della forza colombiana che si esercita nel campo quadrupolare su una carica elementare positiva, seguono **solo queste due direzioni, cioè, quelle degli assi x e y** . L'asse z deve essere immaginato come parallelo alle aste d'acciaio del quadrupolo . (<https://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id>)

Un dato ione, perverrà al rivelatore esclusivamente quando i voltaggi applicati gli consentiranno di percorrere una traiettoria stabile nell'attraversare il quadrupolo, come abbiamo accennato nella breve trattazione. I suoi

parametri di moto devono corrispondere alla **equazione differenziale di Mathieu** (1868). (Una completa descrizione della traiettoria di un qualsiasi ione in funzione delle sue condizioni iniziali viene data da un insieme di tre equazioni differenziali. La soluzione di una delle tre è banale, indica che la posizione e la velocità di uno ione lungo l'asse delle z non viene influenzata da qualsiasi potenziale applicato agli elettrodi. L'uso di elettrodi di sezione iperbolica porta a equazioni del moto che non contengono termini misti in coordinate. Cioè il moto delle particelle rimane indipendente lungo ciascuno dei tre assi di coordinate. L'equazione **differenziale di Mathieu** è la seguente: $y'' + (a - 2b \cos 2x)y = 0$, con a e b costanti. (http://cgs.unipv.it/file_pdf/didatticamelleriotot.pdf.)



$U =$ corrente continua d.c.

$$\pm \phi_0 = U + V \cdot \cos \omega \cdot t$$

$V = \cos \omega \cdot t$ voltaggio alternato r.f., dipendente dal tempo

Cioè il moto delle particelle rimane indipendente lungo ciascuno dei tre assi di coordinate.

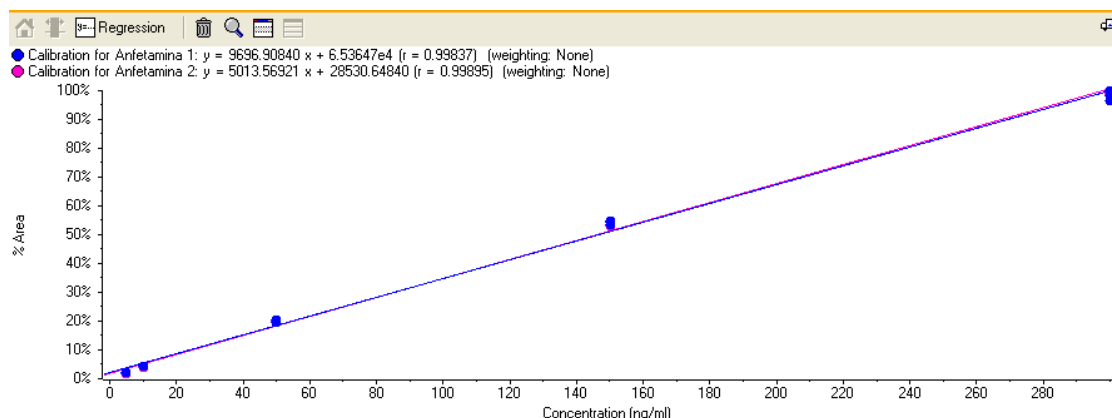
$$\Phi_0 = U + V \cdot \cos \omega \cdot t$$

Se Φ [Phi] indica il potenziale (in Volt), $\pm \Phi_0$ esprime il voltaggio ai poli positivi Φ_+ e a quelli negativi Φ_- . Per ottenere un campo simmetrico e lineare la sezione delle barre di molibdeno o di acciaio dovrebbero mostrare una superficie di tipo iperbolico. Con l'equazione di Mathieu si disegnano regioni di stabilità e di instabilità nelle quali si spargono statisticamente gli ioni nel campo elettrico quadrupolare.

Sulla nostra modalità di acquisizione dei dati

Nel nostro laboratorio al termine del percorso attraverso API3200QT, gli ioni vengono segnalati come *Extracted ion chromatogram* (XIC) tramite la **MRM** (**Multiple Reaction Monitoring**), cioè l'applicazione della SRM (**Selected Reaction Monitoring**) agli ioni prodotti da uno o più ioni precursori.

■ XIC of +MRM (32 pairs): 136.0/91.1 amu Expected RT: 3.5 ID: Anfetamina 1 f
■ XIC of +MRM (32 pairs): 136.0/119.1 amu Expected RT: 3.5 ID: Anfetamina 2



Per le Rette di calibrazione

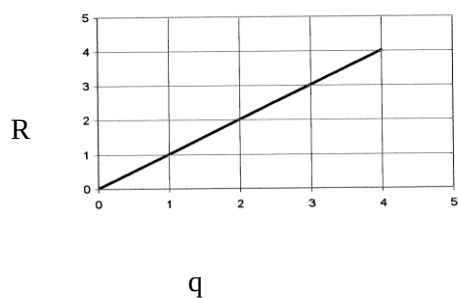
In una ricerca analitica di dati si usano campioni standard per costruire dei grafici "dose/risposta" che rappresentano delle **rette o curve di taratura**.

Si è già fatto uso di sottrazioni del bianco. Infatti prima di preparare una curva di calibrazione e usare il metodo delle aggiunte standard, occorre analizzare **il bianco**, ovvero una soluzione contenente tutti i componenti presenti nel campione tranne l'analita d'interesse.

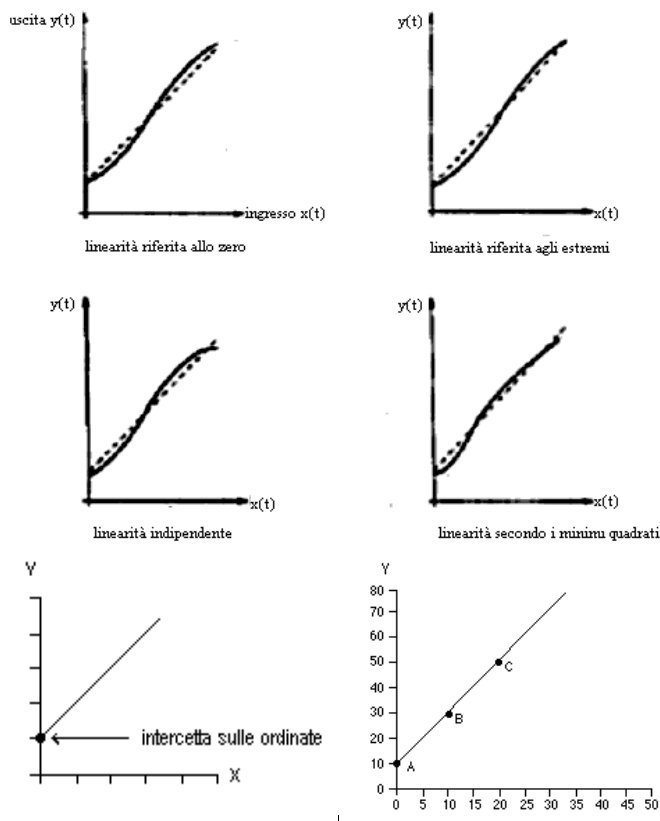
Il **bianco ideale** è costituito dalla stessa **matrice** in cui è contenuto l'analita di interesse. In questo modo si può ottenere il segnale relativo alla "concentrazione zero" di analita.

Il nostro scopo è quello di avere delle rette lineari.

Nel grafico q = valori di x R = valori di y .



Poiché i dati q (q_1 ; q_2 ; q_3 ; q_4) sono certi, quelli dubbi risultano i dati R (R_1 ; R_2 ; R_3 ; R_4), che vanno ricercati. La difficoltà è come si vede quella di trovare l'equazione della retta migliore per i punti in esame. Questo è pertanto un esempio di relazione funzionale lineare ($\Rightarrow$ *equazione di una retta*).



Se $y = a + bx$

b è la pendenza o *slope* o **coefficiente**

angolare: inclinazione della retta sul piano cartesiano, mentre **a** è l'**intercetta:**

intersezione tra la retta e l'asse verticale ($x = 0$)

<http://sabatino.scpol.unige.it/libretto/unit5.html>

In verità come si constata, il diagramma di calibrazione non è sempre esattamente una retta. Uno dei modi più usati per verificarlo è il *coefficiente di correlazione lineare r* detto anche *coefficiente di Pearson*.

r può assumere valori da -1 a $+1$: un valore di $r = -1$ descrive una correlazione perfettamente negativa, cioè tutti i punti stanno su una retta che ha una pendenza negativa, analogamente $r = +1$ indica una perfetta correlazione positiva, cioè i punti sono esattamente su una retta di pendenza positiva. Quando non c'è correlazione tra x e y il valore di **r** si avvicina a **0**.

Con il metodo dei minimi quadrati, se la retta di regressione di y su x è $y = a + bx$, in cui **a** = **intercetta** e **b** = **pendenza (slope)**, esistendo una relazione lineare tra il segnale analitico y (la variabile misurata) e la concentrazione dell'analita x , per calcolare la migliore retta passante per i punti del grafico di calibrazione, si ricerca la retta che minimizzi le deviazioni sia positive che negative, tra i punti sperimentali e la retta calcolata, nella direzione di y , ossia si minimizza la somma dei quadrati degli scarti.

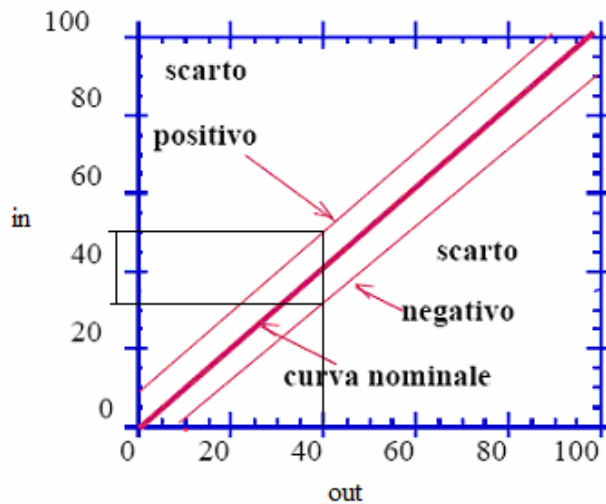


Diagramma di taratura

Si calcola sempre il coefficiente di correlazione lineare r .

La **intercetta** a si ricava come $a = y - bx$.

Si calcola la deviazione "d" da una risposta R e si applicano i quadrati a tutte le distanze riferite ai valori lungo l'asse y . Per chiarire meglio, se la deviazione verticale di ciascun punto dalla linea

retta è chiamata *residuo* o *scarto*, la retta risultante è quella che minimizza la somma dei quadrati degli scarti o residui citati.

Se il calcolo della retta migliore si fa col sistema delle deviazioni standard, definiamo per convenzione le tre quantità S_{xx} , S_{yy} e S_{xy} . (Se non indicato diversamente, la **deviazione standard** sigma (σ) è semplicemente la radice quadrata della **varianza**, la quale viene coerentemente rappresentata con il quadrato di sigma (σ^2).

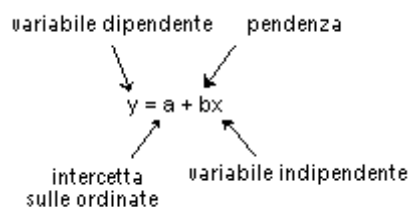
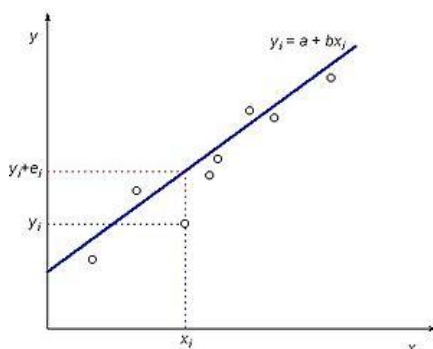
$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \langle x \rangle)^2}{N}} \quad \text{dove} \quad \langle x \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad \text{è semplicemente la media aritmetica.})$$

Calcolando S_{xx} , S_{yy} e S_{xy} possiamo calcolare la pendenza b della retta :

$$b = S_{xy}/S_{xx}$$

e l'intercetta a

$$a = y - bx$$



Altrimenti detto, S_{xx} e S_{yy} sono la somma dei quadrati delle deviazioni dalla media dei singoli valori di x e di y . Le 3 quantità citate, S_{xx} , S_{yy} e S_{xy} si possono definire come segue: Es. : Se con Σ esprimiamo la sommatoria, avremo per S_{xx} (e analogamente si deve supporre per le altre quantità S_{yy} e S_{xy})

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \text{ dove } x_i \text{ e } y_i \text{ sono singole coppie di dati per } x \text{ e } y;$$

Così, N è il numero di coppie di dati per x e y usato per preparare la curva di calibrazione.

Infine $\bar{x}$ e $\bar{y}$ sono i valori medi delle variabili. Procedendo

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N} \quad \text{e} \quad \bar{y} = \frac{\sum y_i}{N}$$

4. RISULTATI

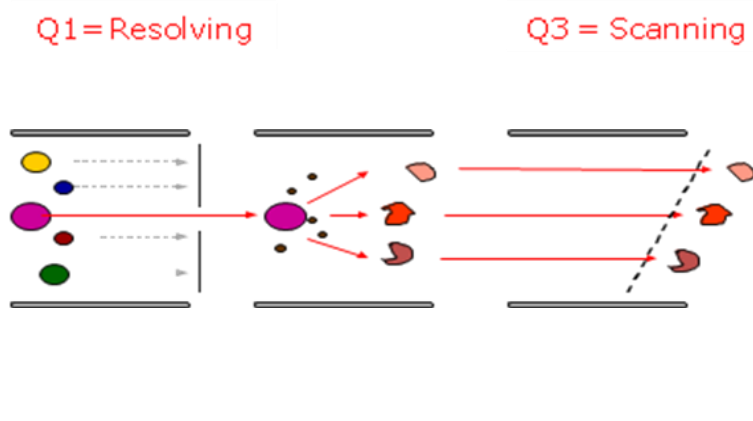
Nel presente lavoro, le sostanze d'abuso dosate nel nostro Laboratorio di Tossicologia Forense sono state sottoposte a molteplici tentativi per arrivare a definire una "curva standard", idonea alla rilevazione di ogni sostanza considerata potenzialmente presente nei campioni sconosciuti, per i quali, qualsiasi utilizzo legale è subordinato alla validazione del metodo di analisi, che in questo caso riguarda un HPLC/MS, strumento adoperato per test di "conferma" dotato di un'altissima risoluzione. La curva di calibrazione dello standard deve coprire l'atteso intervallo di concentrazione del campione sconosciuto, dal più basso (per esempio il campione di un assuntore occasionale) al più alto (per esempio il campione di un tossicodipendente). I numerosi procedimenti in corso d'opera, hanno permesso di definire una curva standard a base di matrice (urina umana): 10, 30, 75, 150, 300 ng/ml. Tutto ciò è stato possibile dopo aver iniettato standard internazionali di matrice pura, per vedere come ogni sostanza viene frammentata dallo strumento e quindi costruire un "data base personale", necessario per istituire procedure operative standard (POS) e garantire quindi attendibilità delle risposte fornite ai quesiti medico-legali. La tabella che segue riporta le frammentazioni di tutte le sostanze, alla quale seguiranno Analisi Qualitativa di alcune delle sostanze considerate, e poi l'Analisi Quantitativa di tutte le sostanze d'abuso dosabili in questo Laboratorio con relative curve di calibrazione.

RISULTATI DEL NOSTRO METODO

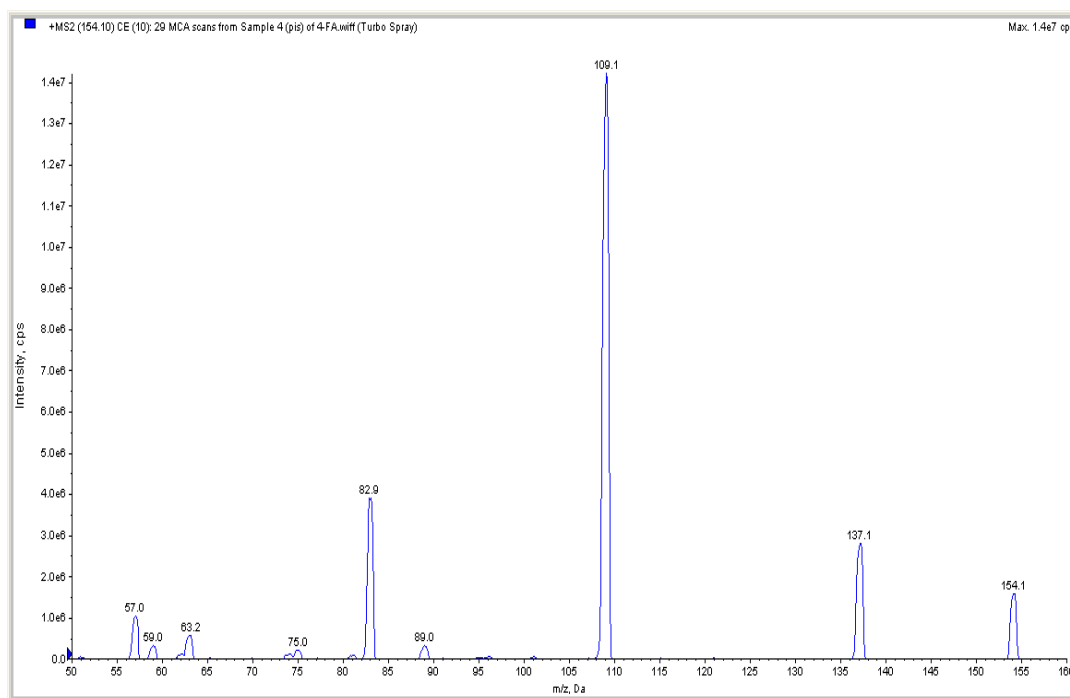
Q1	Q3	Dwell time	ID	DP	EP	CE	CXP
328.1	152.1	3.4	6 ACETILMORFINA 1	63	9	92	3.5
328.1	165.1	3.4	6 ACETILMORFINA 2	63	9	49	3.5
136.1	91.1	3.5	Anfetamina 1	33	4	25	3
136.1	119.1	3.5	Anfetamina 2	33	4	11	3
290.1	168.2	3.7	Benzoylecgonina 1	49	8	25	3.5
290.1	105	3.7	Benzoylecgonina 2	49	8	41	3.5
468.3	55.1	4.1	BUPRENORFINA 1	79	8	90	2
468.3	83.1	4.1	BUPRENORFINA 2	79	8	75	2
304.2	182.2	3.8	COCAINA 1	45	5	25	4
304.2	105.2	3.8	COCAINA 2	45	5	47	2.5
304.2	77	3.8	COCAINA 3	45	5	80	2.5
300.1	115.1	3.3	Codeina 1	60	5	97	3
300.1	152.1	3.3	Codeina 2	60	5	84	3
345.1	193.2	5.7	COOH-THC 1	45	5	35	4
345.1	299.5	5.7	COOH-THC 2	45	5	25	4
278.2	234.3	4.1	EDDP 1	63	5	40	4
278.2	249.3	4.1	EDDP 2	63	5	30	4
180.1	133.1	3.6	MDA 1	20	5	22	2
180.1	135.1	3.6	MDA 2	20	5	25	2
194.1	163.1	3.5	MDMA 1	31	5	16	5
194.1	105.1	3.5	MDMA 2	31	5	32	5
310.2	265.2	4.3	Metadone 1	39	4	19	4
310.2	105.2	4.3	Metadone 2	39	4	38	4
150.2	91.1	3.4	Metanfetamina 1	27	10	26	2
150.2	119.2	3.4	Metanfetamina 2	27	10	14	2
286.1	152.2	3.2	Morfina 1	68	10	80	3
286.2	165.1	3.2	Morfina 2	68	10	55	3
414	187.2	3.8	NORBUPRENORFINA 1	95	8	50	3
414	101.2	3.8	NORBUPRENORFINA 2	95	8	54	3
324.2	223.1	4.2	LSD 1	44	10	35	4
324.2	208	4.2	LSD 2	44	10	35	4

ANALISI QUALITATIVA

L'analisi qualitativa permette di determinare la massa atomica della sostanza, rappresentata dallo ione precursore (Il quadrupolo Q1 opera in modalità “Full scan”, permettendo all'operatore di decidere in quale range lavorare). Questo ione precursore viene quindi frammentato (Il quadrupolo Q3 opera in “only mode”, cioè trasmette indistintamente) in due stadi di analisi di massa MS/MS, dando vita agli ioni “figli” o ioni “prodotto” risultanti da questa frammentazione.



Ottenendo il seguente spettro di massa:



Di seguito si riportano i cromatogrammi di alcune sostanze pure.

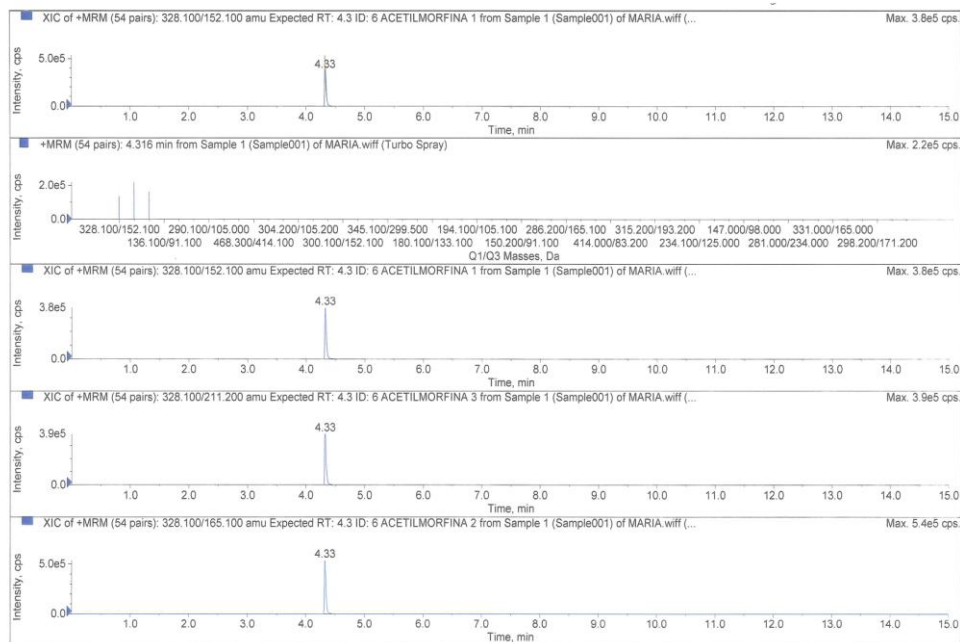
I frammenti rilevati di alcune delle sostanze considerate sono identificativi e specifici, tali da assicurare il riconoscimento della sostanza stessa eventualmente presente nel campione ignoto.

6-ACETIL MORFINA

Printing Time: 9:33:07 AM
Printing Date: Friday, March 01, 2013

Analyst Version: 1.5.1
*APE 3200 QT 5/N AF23631103

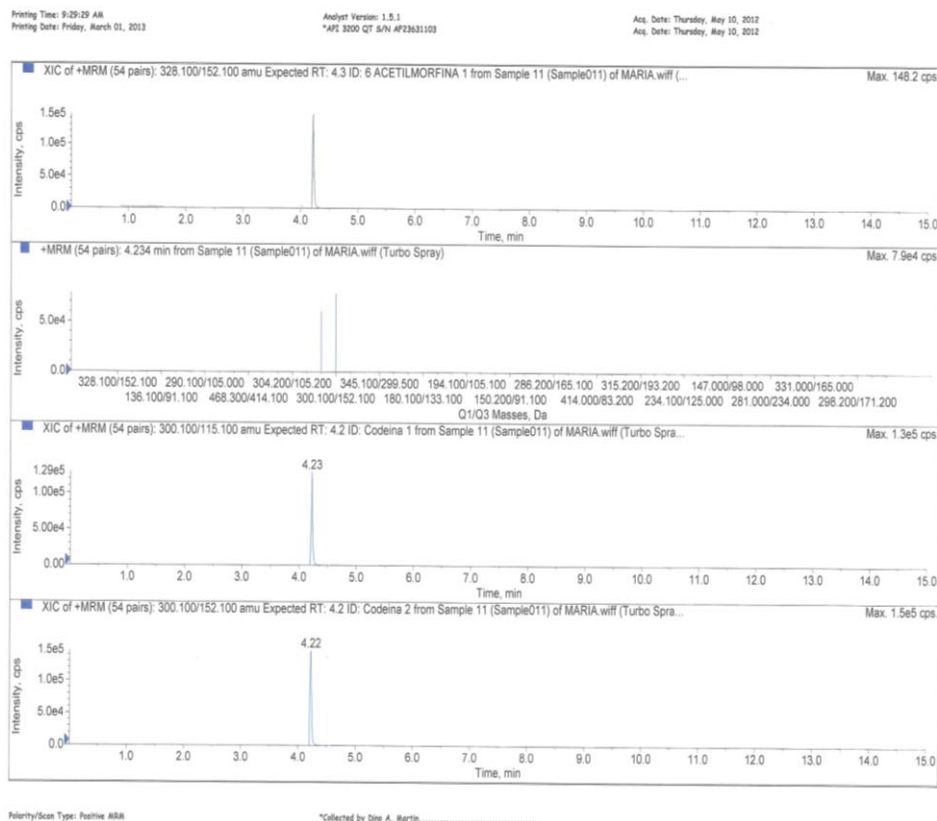
Acq. Date: Thursday, May 10, 2012
Acq. Date: Thursday, May 10, 2012



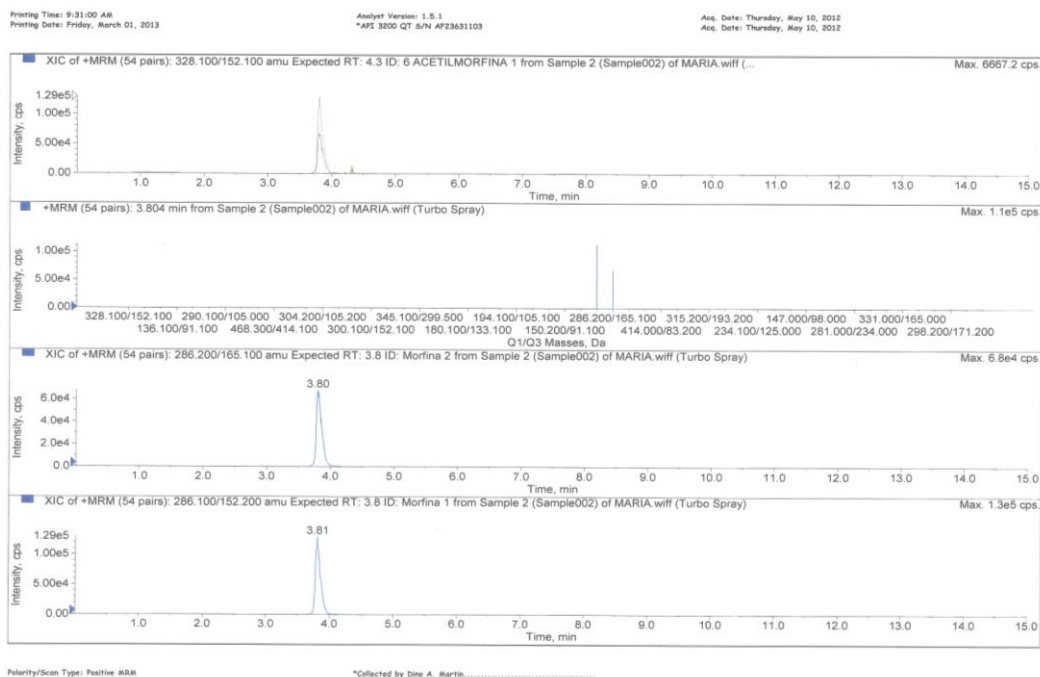
Polarity/Scan Type: Positive MRM

*Collected by Dino A. Martin.....

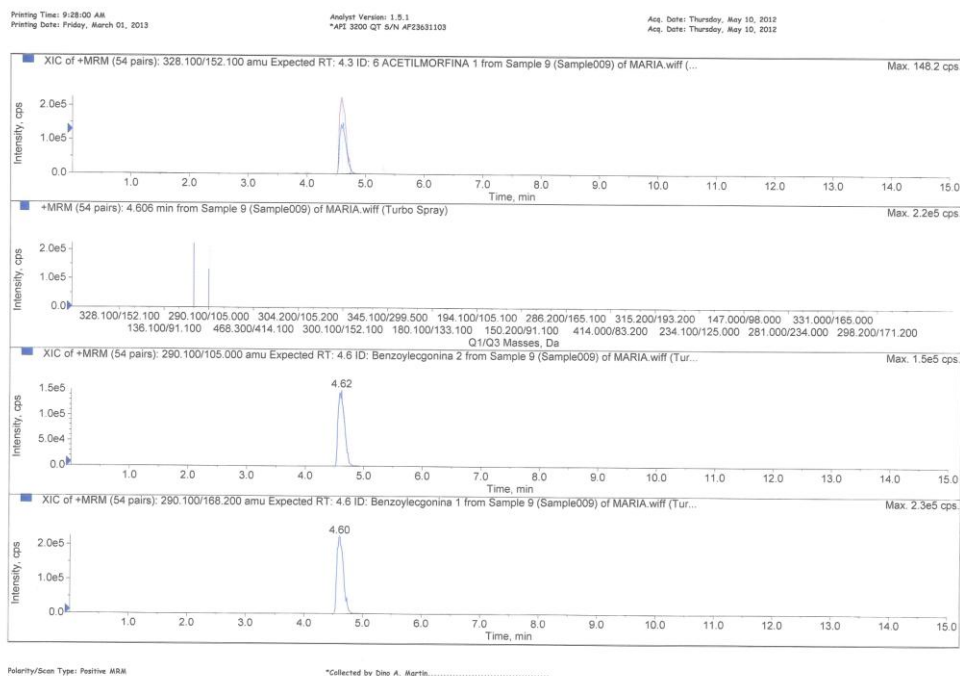
CODEINA



MORFINA



BENZOILECGONINA

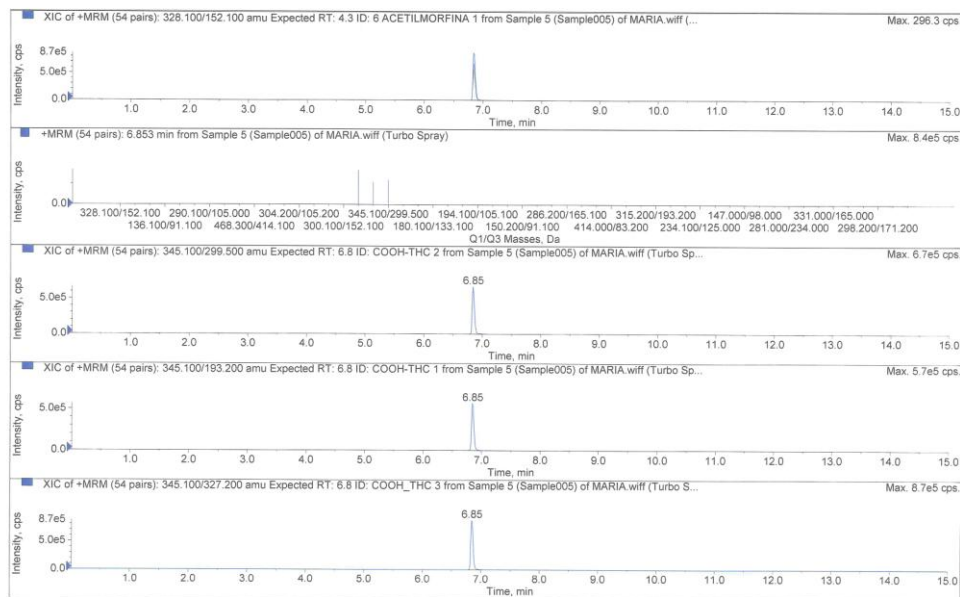


THC-COOH

Printing Time: 9:24:39 AM
Printing Date: Friday, March 01, 2013

Analyst Version: 1.5.1
*AFI 3200 QT 5/N AF23631103

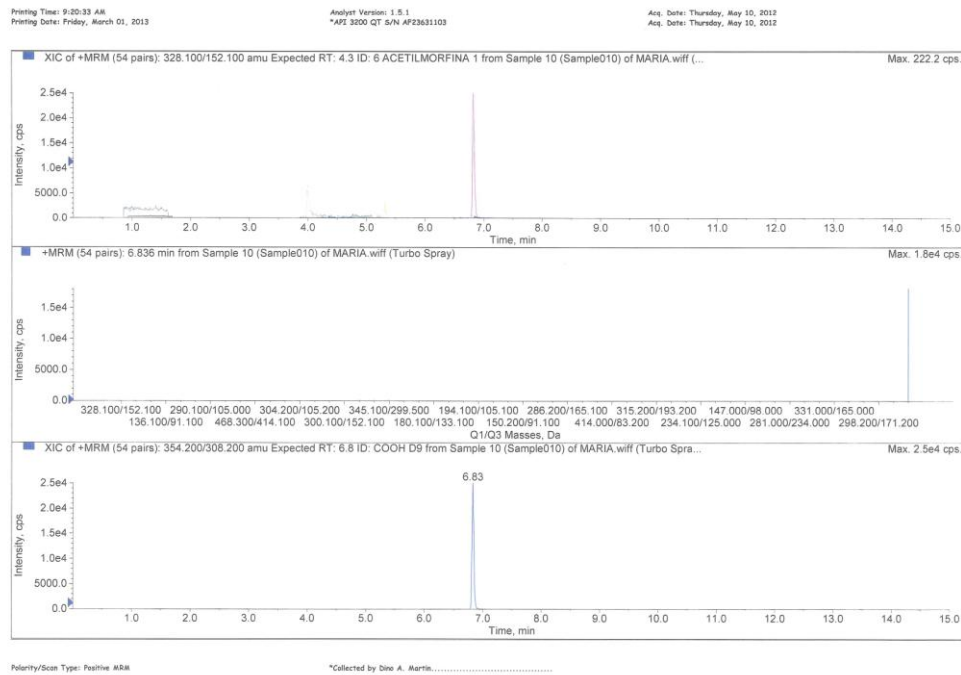
Acq. Date: Thursday, May 10, 2012
Acq. Date: Thursday, May 10, 2012



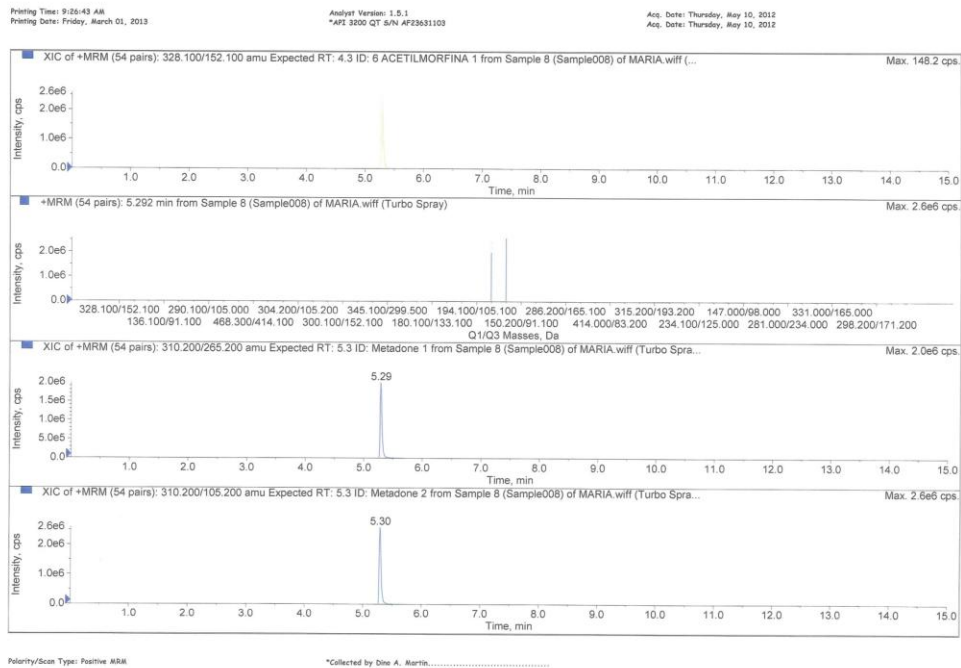
Polarity/Scan Type: Positive MRM

*Collected by Dine A. Martin

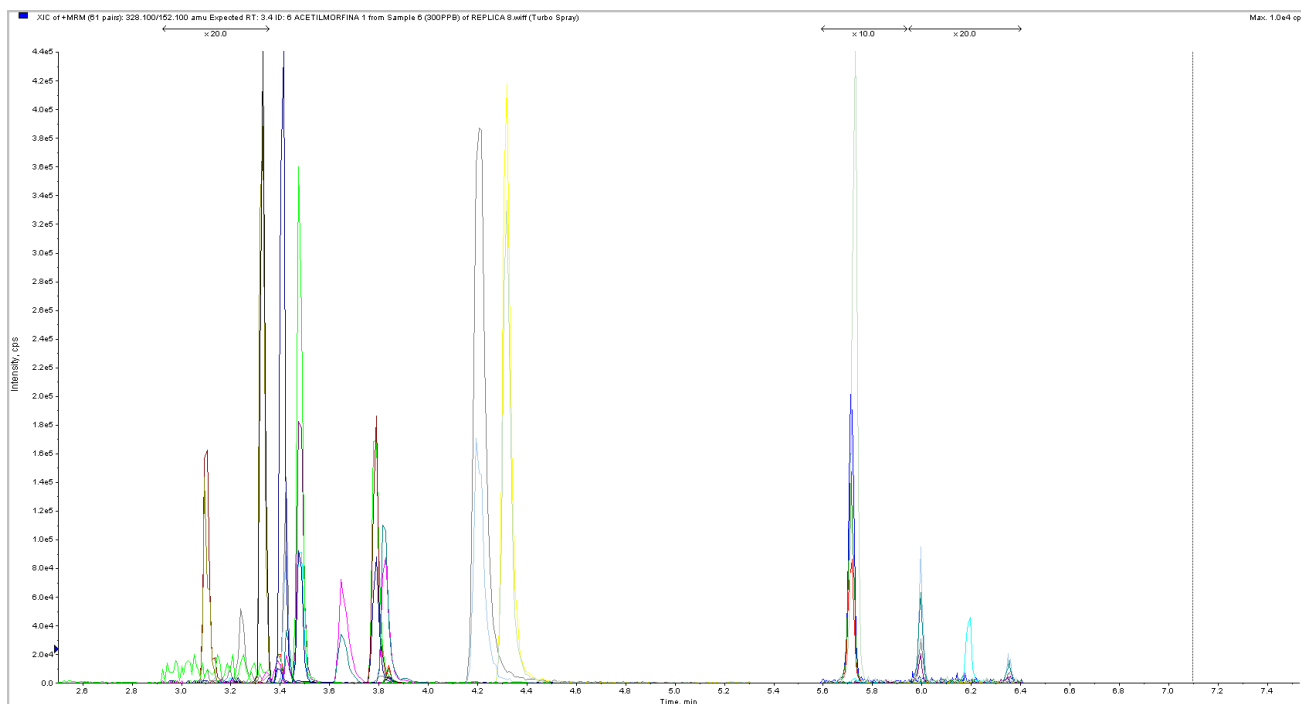
THC-COOH D9 (Deuterato)



METADONE



Abbiamo eseguito un'unica iniezione con tutti gli analiti di interesse (MULTIRESIDUO), garantendo all'operatore la possibilità di accorciare i tempi di studio di tutte le sostanze dosate in questo Laboratorio.

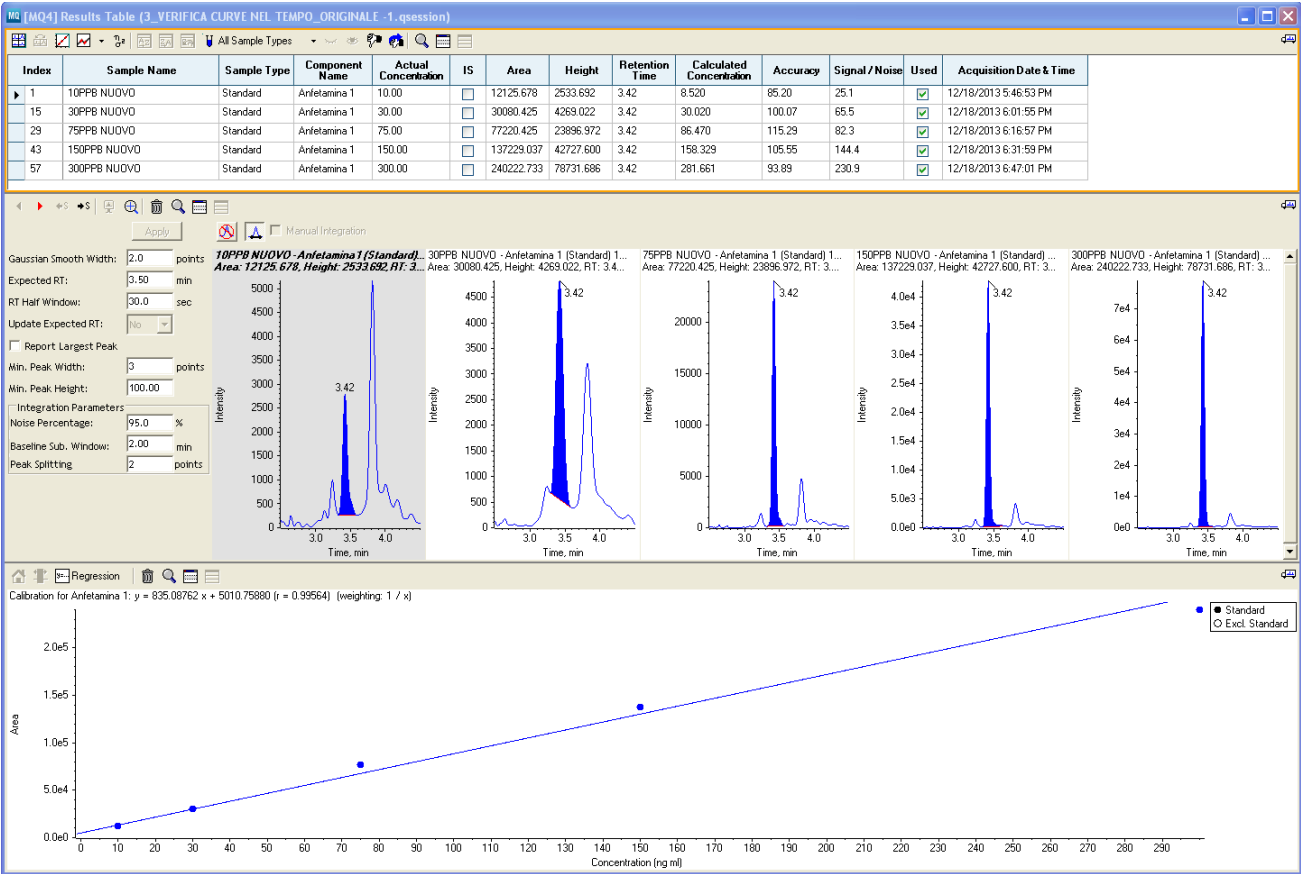


All'analisi qualitativa degli analiti appartenenti alle Famiglie principali delle droghe d'abuso, segue

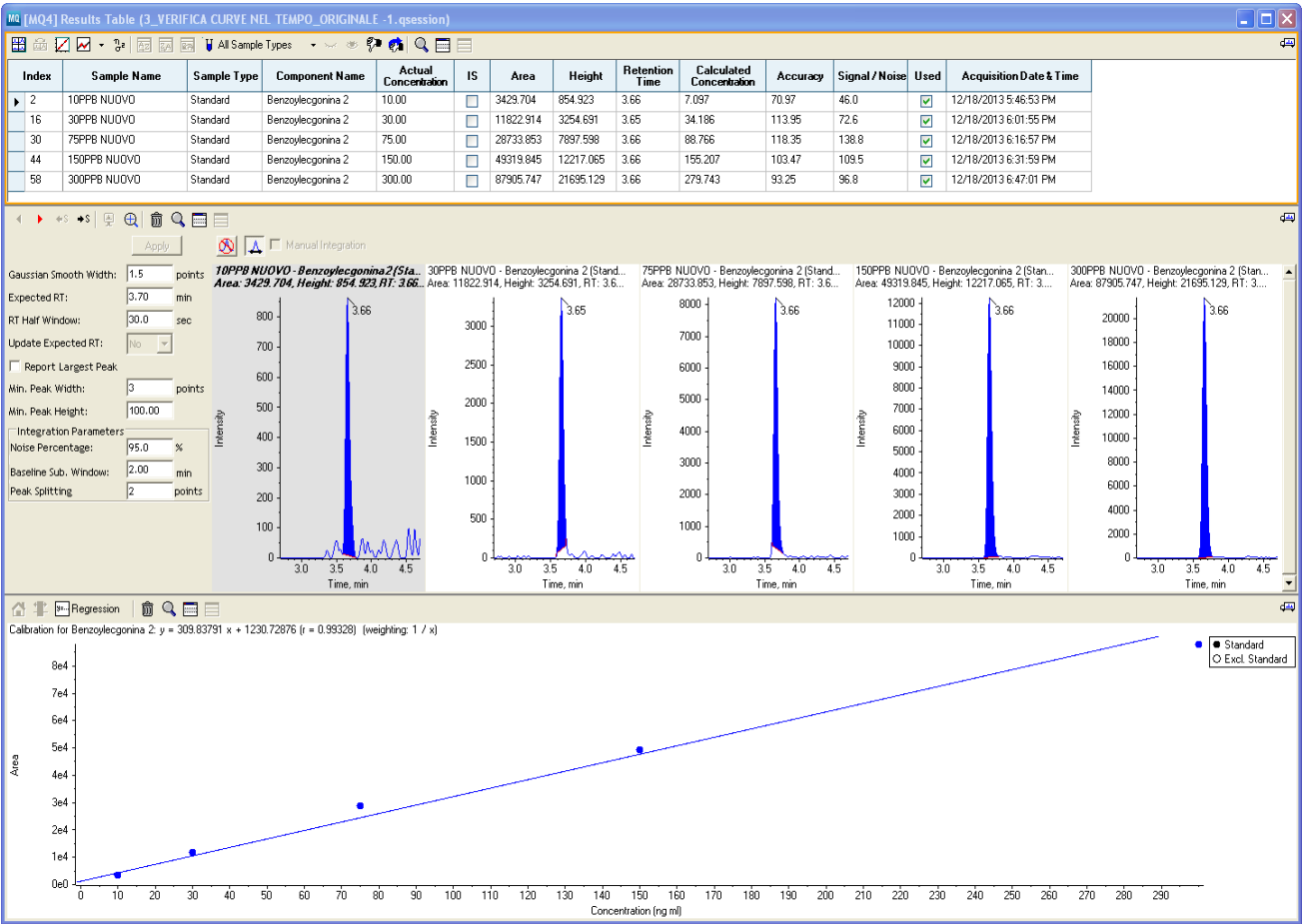
L'ANALISI QUANTITATIVA

L'esperimento denominato MRM (Multiple Reaction Monitoring) consente la rilevazione delle singole specie da una miscela complessa (vedi cromatogramma precedente). Mediante campioni di matrice urinaria addizionata di standard puri diluiti a concentrazioni variabili; dopo numerosi procedimenti è stato possibile stabilire una retta di calibrazione per tutte le sostanze stupefacenti dosate presso il nostro Laboratorio.

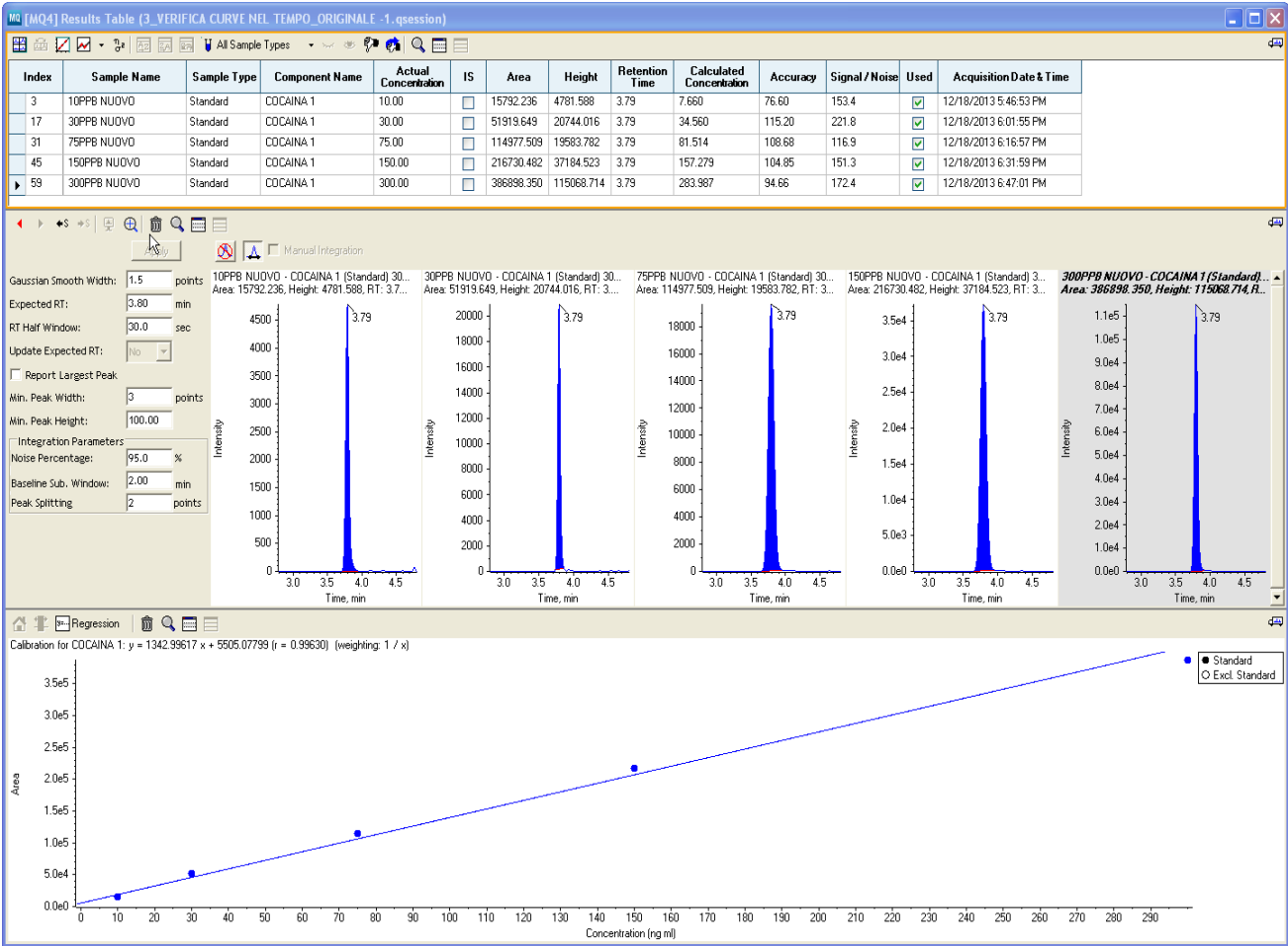
ANFETAMINA



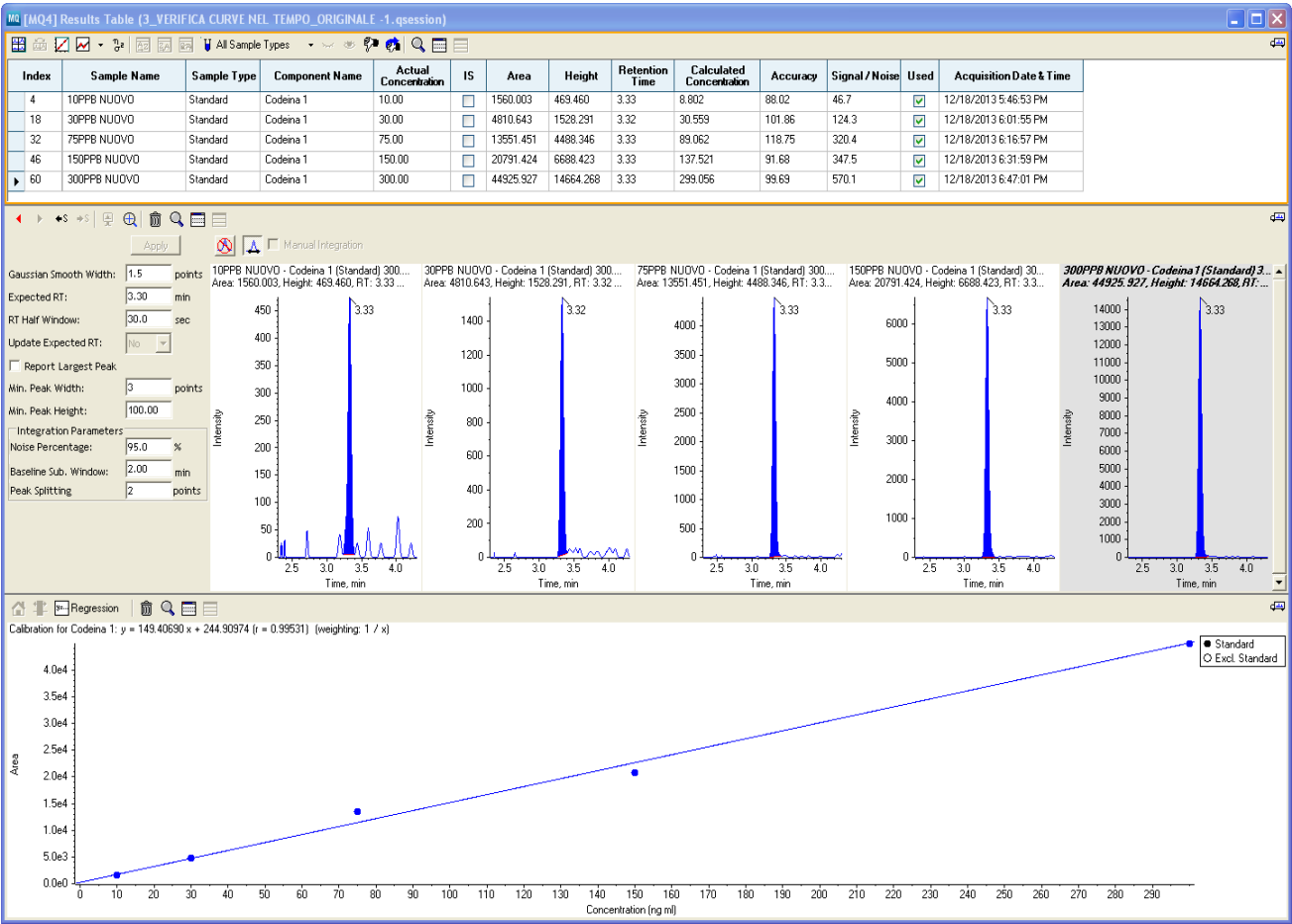
BENZOILECGONINA



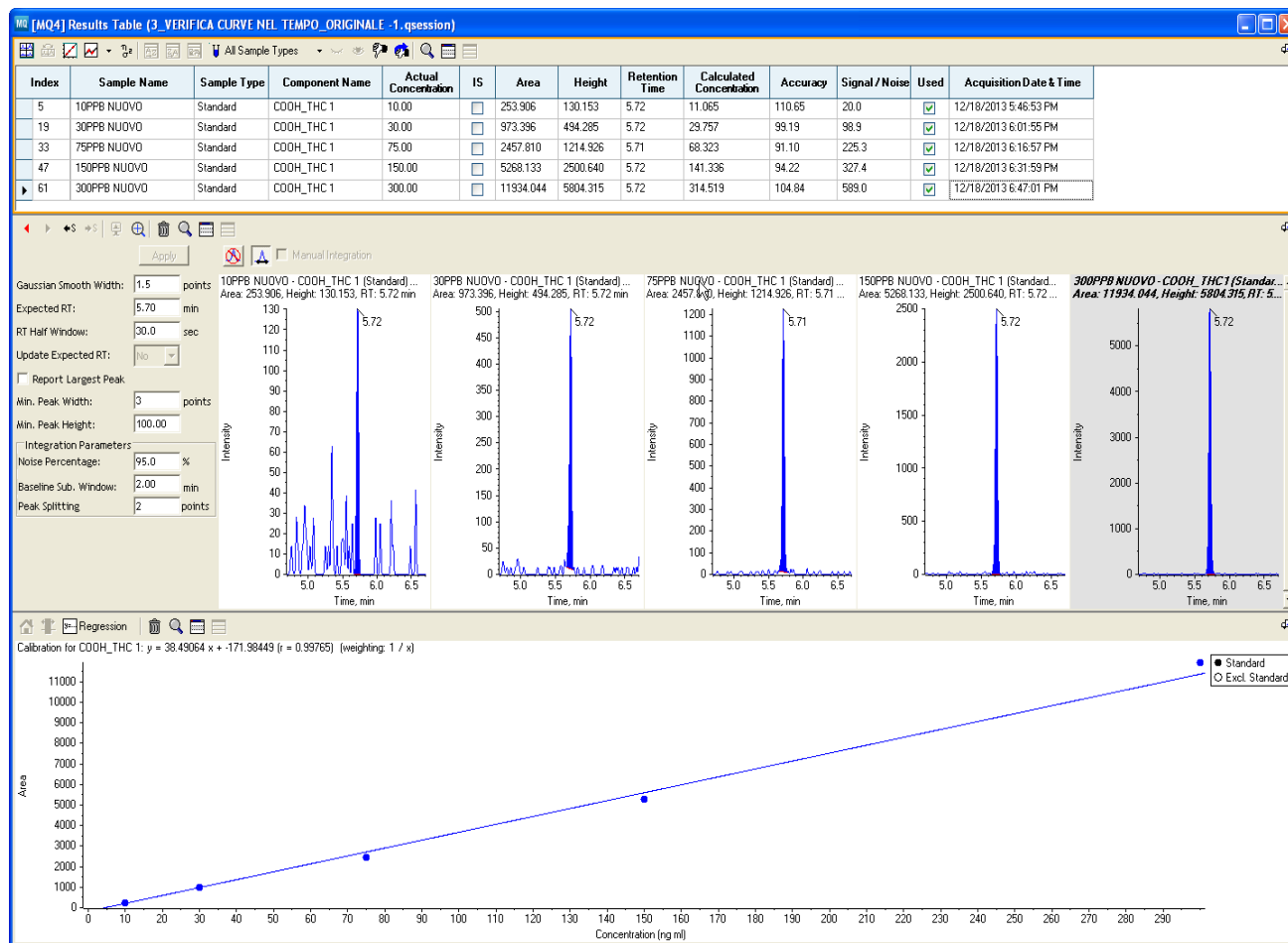
COCAINA



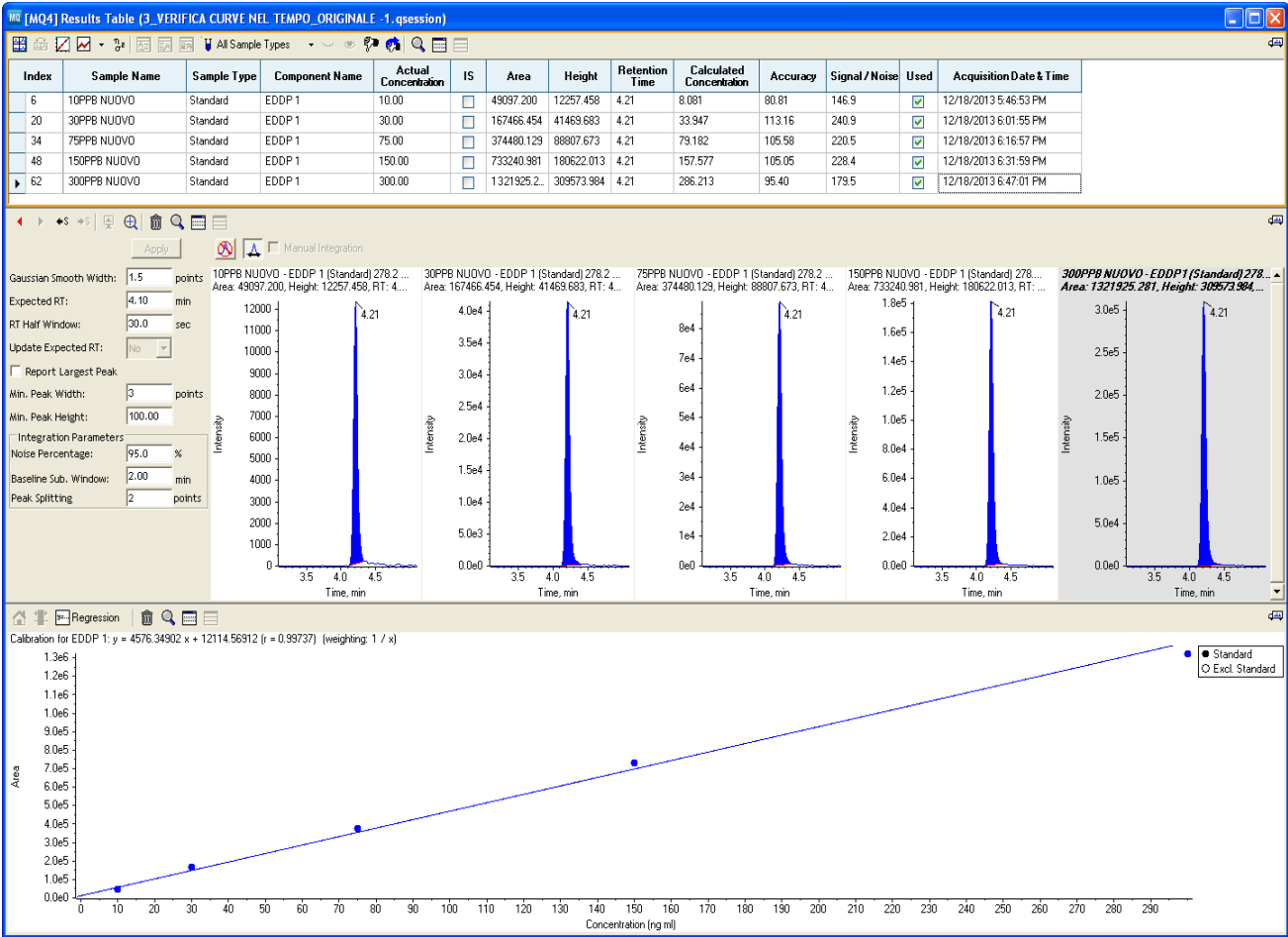
CODEINA



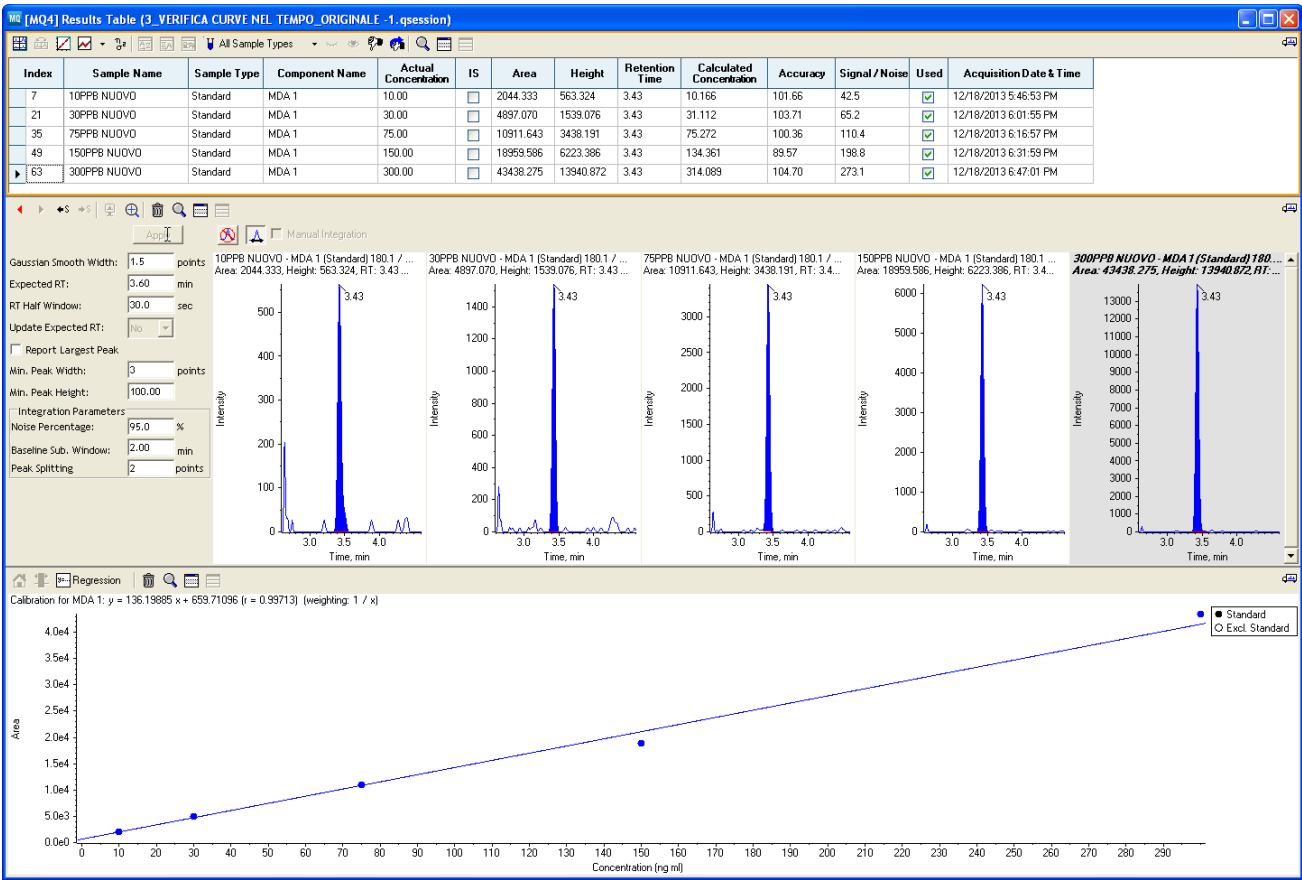
THC-COOH



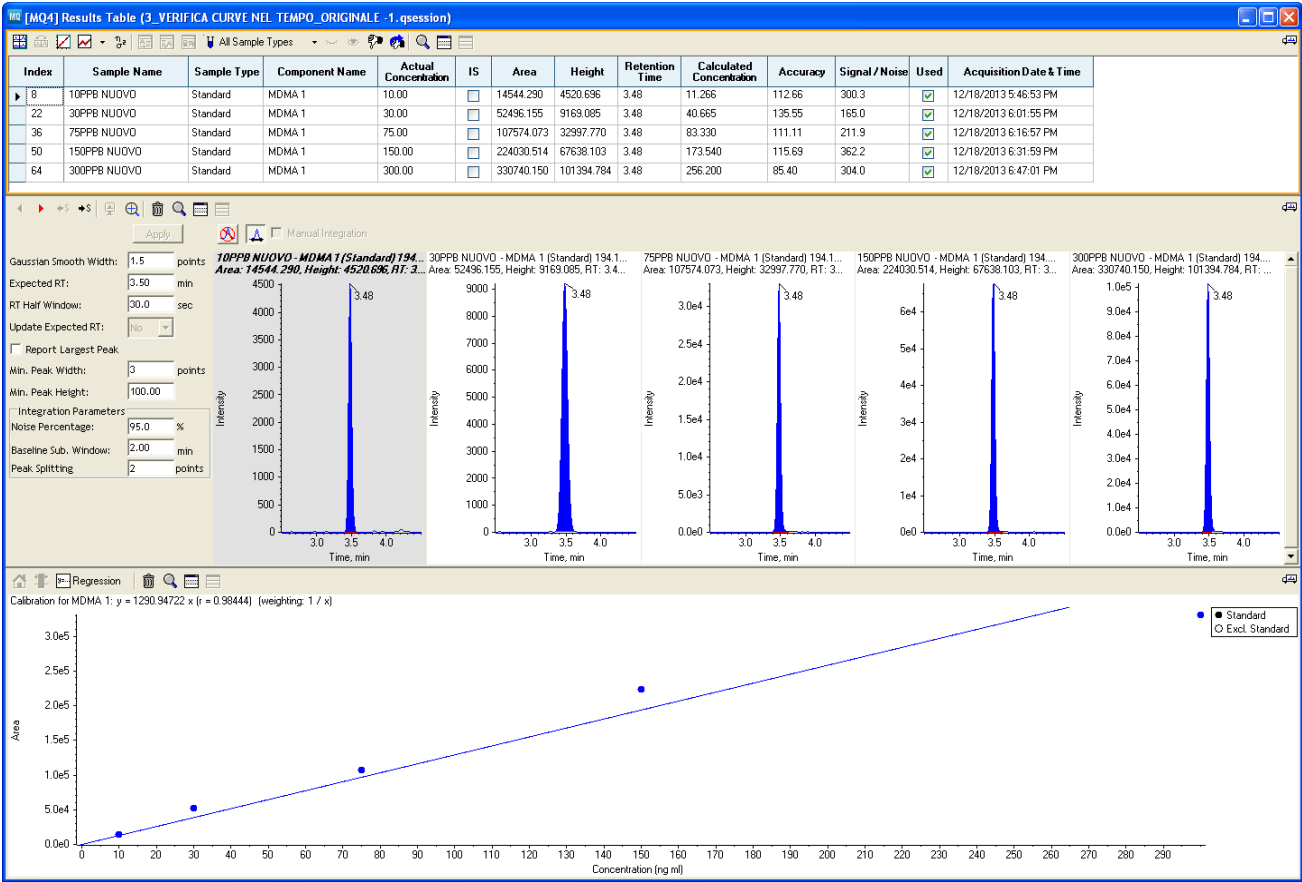
EDDP (2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina)



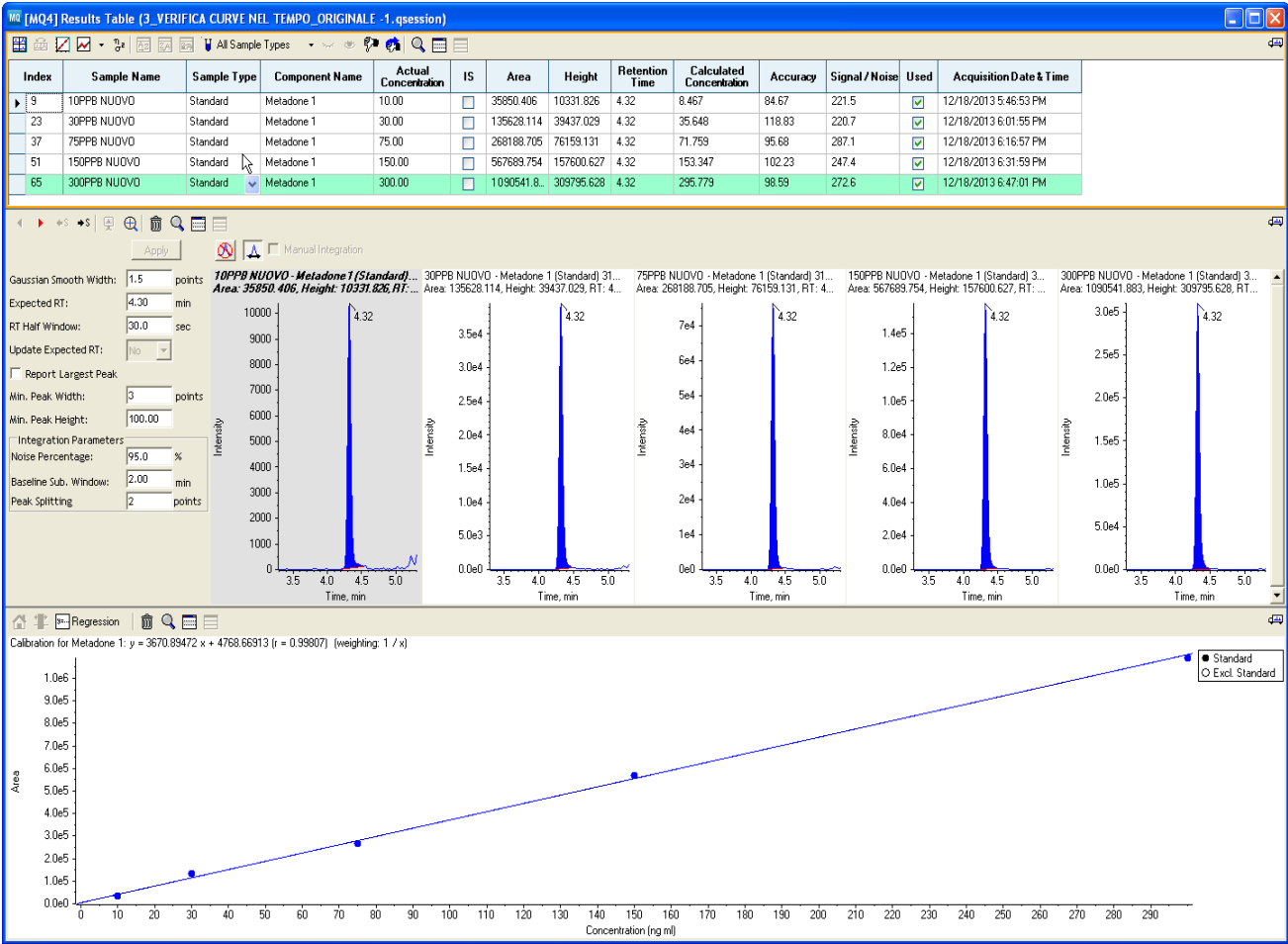
MDA(3,4metilenediossianfetamina)



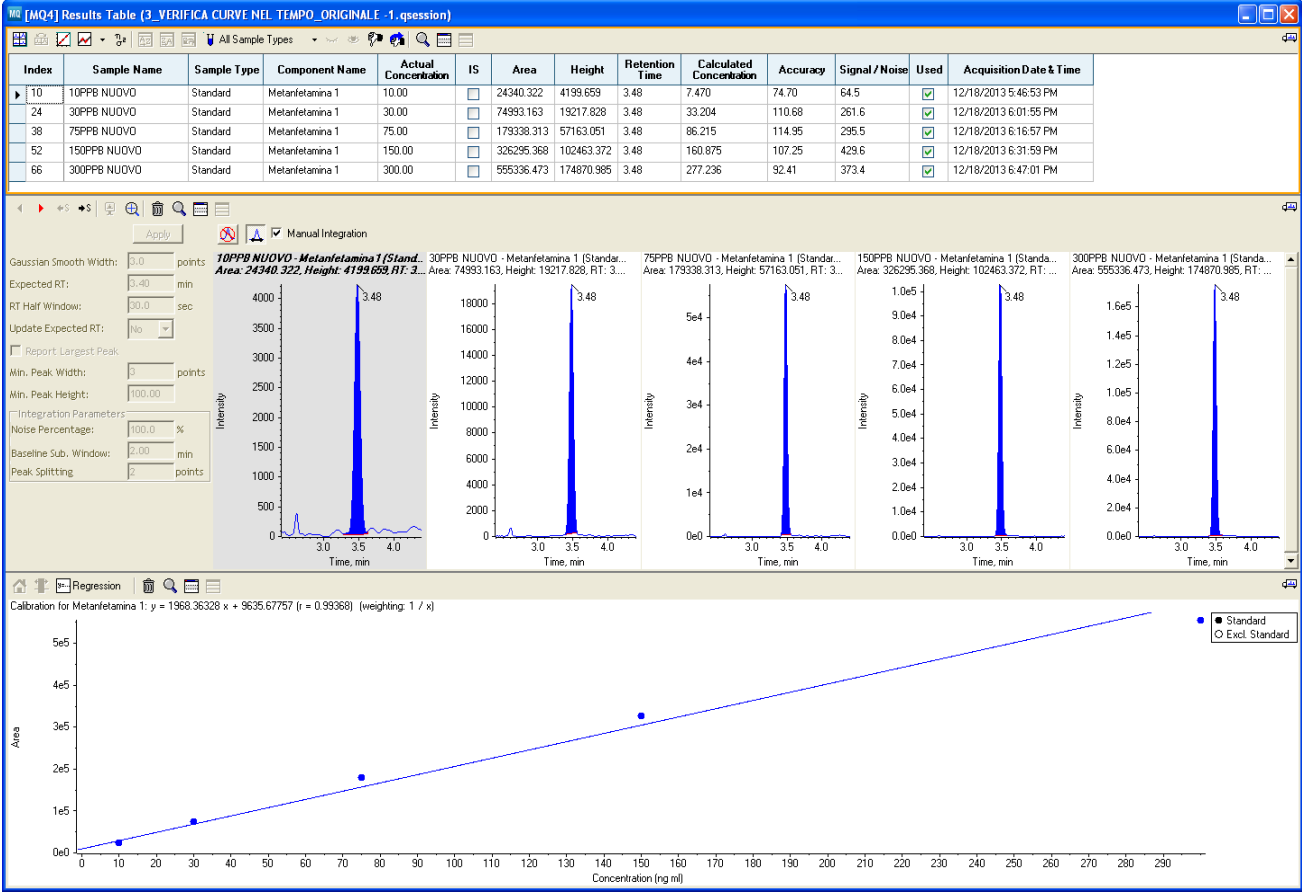
MDMA (3,4 metilenediossimetanfetamina)



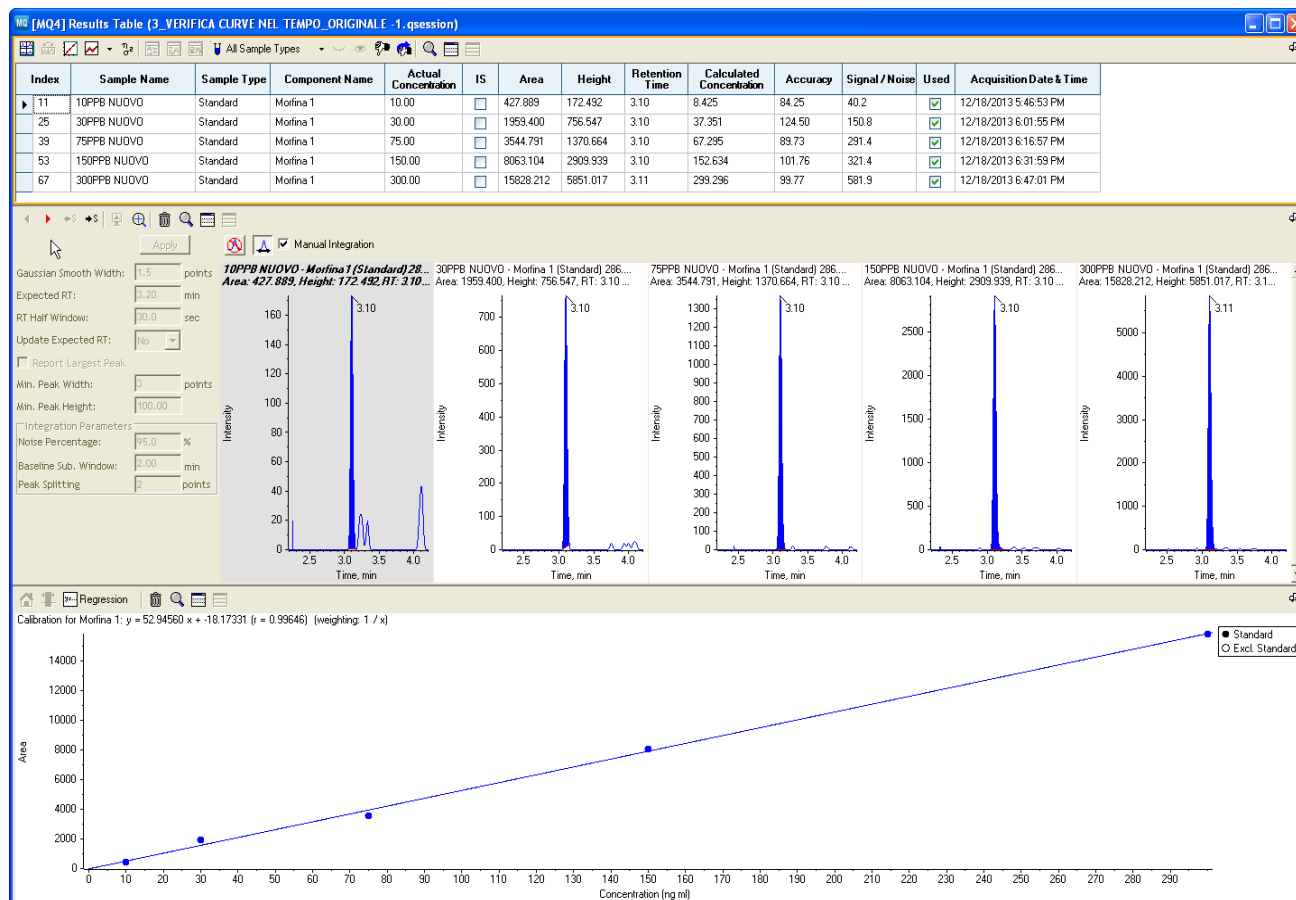
METADONE



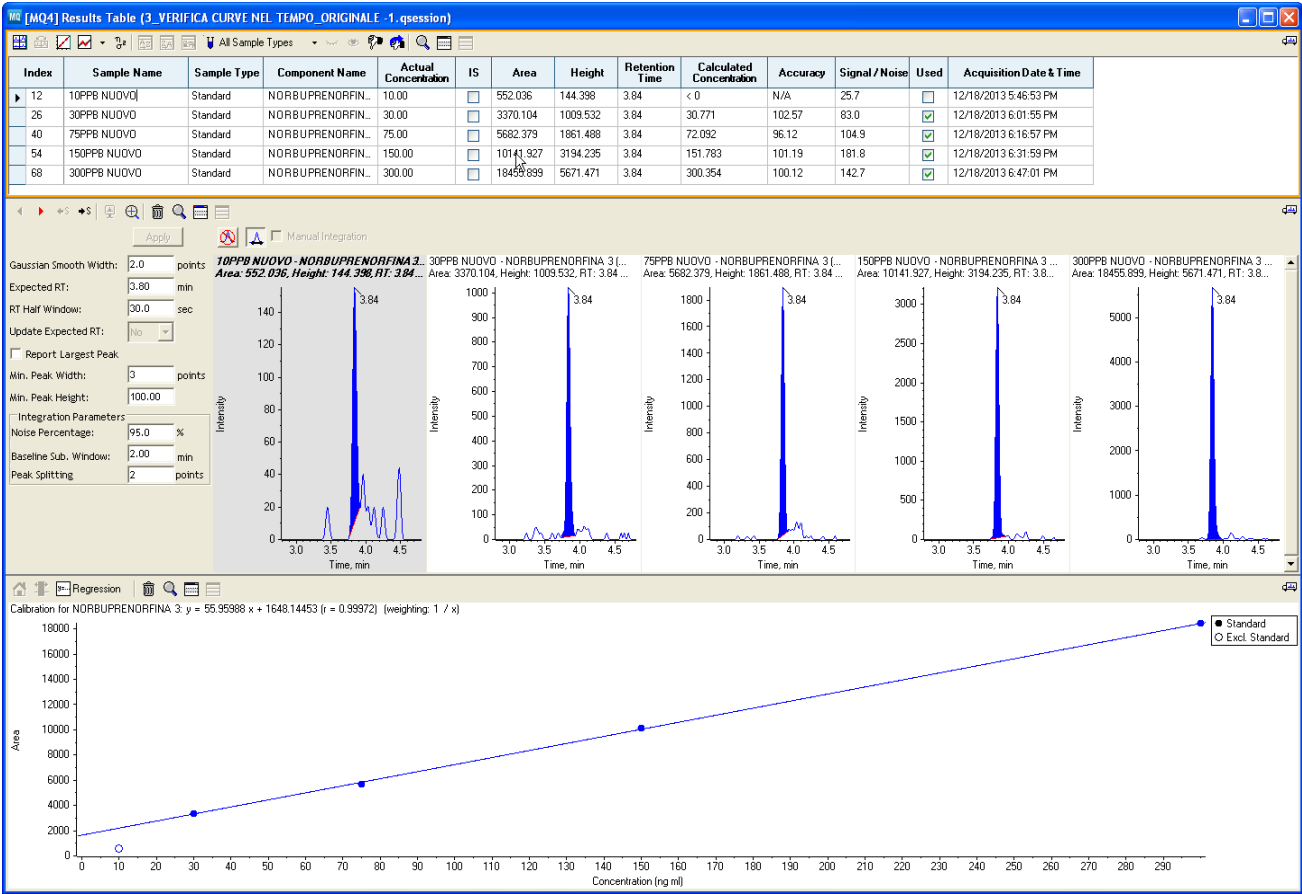
METANFETAMINA



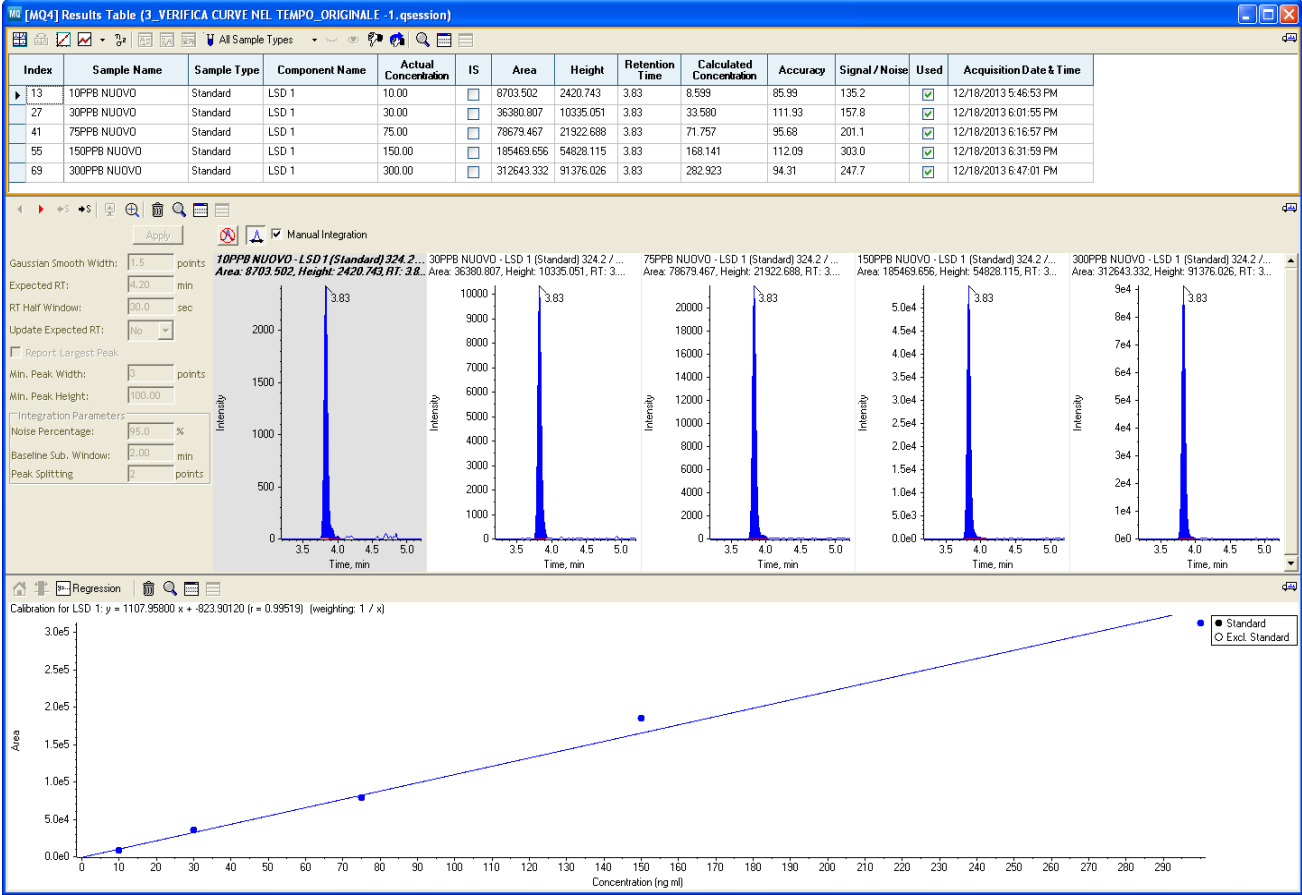
MORFINA



NORBUPRENORFINA



LSD (diethylamide-25 dell'acido lisergico)Alcaloide



5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

E' importante sottolineare che gli analiti sono considerati secondo le differenti classi chimiche e sono caratterizzati da differenti proprietà di acidità che influiscono largamente sulla scelta dell'estrazione e delle condizioni cromatografiche.

Quindi, tenendo presente quanto i parametri del metodo possano essere influenzati, sono stati ottenuti dati con alto livello di attendibilità e pertanto rispondenti allo scopo.

A dimostrazione della precisione del metodo, i risultati uniformi per tutte le sostanze d'abuso considerate, hanno permesso la realizzazione di un'unica retta.

Il limite di rivelabilità (LOD) degli analiti in studio è stato calcolato come concentrazione corrispondente all'area del picco sommandola al triplo della deviazione standard, risultando pari a 5 ng/ml, sicuramente riconosciuto ma non quantificato con CV% accettabile (Coefficiente di Variabilità delle iniezioni). Il limite di quantificazione (LOQ), aggiungendo 10 volte la deviazione standard mediante calcolo software, era pari a 10 ng/ml, con accuratezza dell'82%, più bassa delle altre concentrazioni ma pur sempre accettabile. Lo strumento in dotazione aggiunge automaticamente ai calcoli un fattore di ponderazione (weighting) $1/x$ e per ogni analita il picco è stato ottenuto mantenendosi nei limiti di controllo pari a 3σ nei differenti livelli di concentrazione.

Come esempio di esecuzione dell'analisi QUALITATIVA, si commenta il grafico della 6-Mono-Acetil morfina

Nel primo cromatogramma della 6-acetil morfina, si nota dal picco cromatografico che l'analita esce dal cromatografo frammentato come si rileva dai 3 picchi: il 1° a 152 amu, il 2° a 211 amu, il 3° a 165 amu. La massa atomica è 328. Dato che il nostro strumento è di tipo ESI (electrospray ionitation), cioè con ionizzazione per elettro-nebulizzazione, può produrre diversi tipi di ioni a seconda dei parametri utilizzati e del tipo di campione. In questo caso si tratta di Ionizzazione POSITIVA, cioè con formazione di ioni molecolari M^+ e pseudo molecolari $[M+H]^+$. Quindi la massa atomica della 6-acetil morfina sarà di 328+1. Questa tecnica di ionizzazione viene scelta in maniera tale da favorire la formazione di un solo tipo di ioni, per rendere massima la sensibilità mantenendo tutta la corrente ionica su un singolo rapporto massa/carica= m/z . Questo ione "genitore" o precursore viene quindi frammentato. L'accoppiamento di due stadi di analisi di massa (MS/MS) permette di analizzare gli ioni "figli" o ioni prodotto risultanti da questa frammentazione.

Come esempio di esecuzione dell'analisi QUANTITATIVA delle sostanze d'abuso considerate, descrivo quella dell'ANFETAMINA.

Nell'osservazione del picco è importante valutare

- 1) Il tempo di ritenzione
- 2) La presenza dei due frammenti
- 3) L'abbondanza dei frammenti

Il tempo di ritenzione per l'anfetamina è pari a 3.42, come si evince dal grafico.

Per quanto riguarda la retta di calibrazione, è importante valutare la pendenza: $Y = a + bX$

b è la pendenza o *slope*, inclinazione della retta sul piano cartesiano;

a è l'intercetta, intersezione tra la retta e l'asse verticale.

Quanto più la risposta è alta tanto più l'angolo formato dalla retta sul piano cartesiano aumenta, a parità di concentrazione con altre determinazioni. La retta può essere corretta, ma se varia la pendenza c'è una maggior dispersione di punti. All'aumentare del rapporto "signal/noise", segnale/disturbo, di 10 c.a., è dimostrata una maggiore precisione.

Nell'osservazione del picco si deve tener conto che più alto esso risulta più ci si allontana dal rumore di fondo.

Il "Gaussian Smooth", permette all'operatore di rielaborare un picco migliore per la possibilità di "ammorbidire" due o tre punti della curva grezza, purché siano a concentrazioni consecutivamente crescenti.

"Expected RT", è il tempo di ritenzione atteso.

"Peak Splitting", permette di sapere quante volte si intercetta il rumore di fondo.

In conclusione possiamo affermare che i punti determinati: 10, 30, 75, 150, 300 ng/ml dimostrano una buona linearità (LOL), in relazione alla concentrazione calcolata. L'accuratezza, prendendo come *optimum* il 100%, aumenta nei punti centrali della retta di calibrazione. L'unico analita che si comporta in modo particolare in questo tipo di ricerca è il THC, a causa dell'eccessiva variabilità del tempo di ritenzione.

Bibliografia

- 3200 QTRAP® LC/MS/MS System, *Hardware Guide*, D1000092202C, Release Date: July 2011. pp. 6-9.
[Trad. d.r.].
- 3200 QTRAP® LC/MS/MS System, *Hardware Guide*, D1000092202C, Release Date: July 2011
- 3200 QTRAP® LC/MS/MS System, *Hardware Guide*, D1000092202C, Release Date: July 2011. p 16.
- AB Applied Biosystem, MDS SCIEX, 2008
- Archer J.P. Martin e Richard L.M. Synge sviluppano, presso la *Wool Industries Research Association* a Leeds, la cromatografia per ripartizione su gel di silice che si affianca a quella per adsorbimento già sviluppata nei decenni precedenti. I due ricercatori inventeranno poi, nel 1944, la cromatografia su carta.
[http://www.treccani.it/enciclopedia/la-grande-scienza-cronologia-scientifica-1941-1950_\(Storia-della-Scienza\)/](http://www.treccani.it/enciclopedia/la-grande-scienza-cronologia-scientifica-1941-1950_(Storia-della-Scienza)/)
- Biemann, K.; Scoble, H.A.. *Science* **1987**, 237,:992–98.
- Borriello R., Caligara M., Chiarotti M., Ferrara SD., Gagliano Candela R. et al. *Linee guida per i laboratori di analisi delle sostanze di abuso in campioni biologici*. Boll Farmacodip Alcool 2002; XXV: 19-26.
- Borriello R., Chiarotti M., Lodi F. *I protocolli operativi per gli artt. 186 e 187 del Codice della Strada: un incipit necessario da sottoporre a verifica attuativa*. Boll Farmacodip Alcool 2005; XXVIII: 1-4.
- Cfr. Hites, Ronald A. (1970). *Computer evaluation of continuously scanned mass spectra of gas chromatographic effluents*. Analytical Chemistry **42** (8): 855.
http://it.wikipedia.org/wiki/Cromatogramma_di_massa
- Cfr. http://it.wikipedia.org/wiki/Cromatografia_di_ripartizione
- Cfr. <http://www.uniurb.it/biotecnologie/didattica/docenti/documents/HPLC.pdf>. n. 6/45.
- Cfr. <http://www.uniurb.it/biotecnologie/didattica/docenti/documents/HPLC.pdf>. n. 33/45.
http://www3.unipv.it/iscr/corso_itp/programmi_dispense/alberti/lez6a_%20cromatografia%20LC.ppt#282,7
- Cfr. Università degli Studi di Roma “La Sapienza”, Facoltà di Farmacia, CdL in Chimica e tecnologia farmaceutiche. Tesi di Laurea sperimentale in Farmacologia: *Il ruolo degli accertamenti tossicologici nell'abuso di cocaina e nei relativi trattamenti della dipendenza. Implicazioni in studi di farmacocinetica*. Relatore: Prof. Luciano Saso, Candidato: Gustavo Merola; Correlatore Dott.sa Teodora Macchia, Dip. del Farmaco – I.S.S. Anno Accademico 2006/07. *Estratto sintetico dell'Introduzione*: La cocaina è un alcaloide che si ottiene dalle foglie della coca (*Erythroxylon coca*), pianta originaria del Perù e della Bolivia, dove veniva usata dagli indigeni per alleviare fame e fatica. A metà dell'ottocento Paolo Mantegazza (“*Sulle virtù igieniche e medicinali della cocaina e degli alimenti nervosi in genere*”) la introdusse in farmacopea. Un chimico farmacista corso, Angelo Mariani, ideava nel 1863 una bevanda preparata con cocaina sciolta in vino: il *Vin Mariani*. Si diceva che risolvesse le malattie nervose, l'impotenza, l'insonnia, etc. Nel 1885, John Styh Pemberton, un farmacista di Atlanta mise a punto, imitando l'originale, la prima bevanda in concorrenza con il Vin

Mariani, il *French Wine Coca*. Pemberton l'anno dopo eliminava l'alcool dalla formula di Mariani e aggiungeva l'estratto di noce Cola, una sostanza ricca di caffeina, oli di agrumi e dolcificanti. Era nata la Coca Cola. Sino al 1903, anno in cui il governo federale statunitense imponeva la de-cocainizzazione delle foglie di coca usate per la preparazione, la cocaina fu un ingrediente della Coca Cola. Vedi <http://www.iss.it/binary/ssps/cont/Tesi.pdf>.

Chiarotti M., Borriello R., Gigli F., Poletti A. *Riflessioni e proposte operative in tema di qualità totale ed accreditamento dei laboratori di tossicologia forense*. Atti del XXXIII Congresso Nazionale SIMLA .Brescia 25-28 ottobre 2000

Chiarotti M., De Giovanni N., Fucci N., Danese D. *Analisi tossicologiche per la ricerca di sostanze d'abuso effettuate con riferimento al DPR 309/90 su un campione di lavoratori nel periodo 1995-1999*. Boll Farmacodip Alcool 2001; XXIV: 42-53; Cone EJ. *Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale*. Forensic Sci Int 2001; 121: 7-15; Verstraete AG., Pierce A. *Workplace drug testing in Europe*. Forensic Sci Int 2001; 121: 2-6.

Chiarotti M., De Giovanni N., Fucci N., Danese D. *Analisi tossicologiche per la ricerca di sostanze d'abuso effettuate con riferimento al DPR 309/90 su un campione di lavoratori nel periodo 1995-1999*. Boll Farmacodip Alcool 2001; XXIV: 42-53; Cone EJ. *Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale*. Forensic Sci Int 2001; 121: 7-15.

Colucci AP, Gagliano Candela R. Validità del dato analitico del laboratorio chimico clinico e tossicologico – Boll. Farmacodip. Alcol. 2004; XXVII: 37-46

Cone EJ. *Saliva testing for drugs of abuse*. Ann. NY Acad Sci 1993; 694:91-127.

Council of European Union. EU drugs action plan (2009-2012); Brussels, 2008

Damasio Antonio Rosa, *L'errore di Cartesio. Emozione, ragione e cervello umano*, Milano, Adelphi, 1995.

Decreto del Presidente della Repubblica n. 309/1990. *Testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza*; Roma, 1990.

Dolan K., Rouen D., Kimber J. *An overview of the use of urine, hair, sweat and saliva to detect drug use*. Drug Alcohol Rev 2004; 23:213-7. Samyn N., De Boeck G., Verstraete AG. *The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers*. J Forensic Sci 2002; 47:1380-7

Drummer OH. Review: *Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid*. Forensic Sci Int 2005; 150: 133-42. Kadehjian L. *Legal issues in oral fluid testing*. Forensic Sci Int 2005; 150: 151-60

EU drugs action plan (2009-12); Council of the European Union 2008

Ferrara S.D. *Doping Antidoping*. Ed. Piccin Nuova Libreria – Padova 2004.

Ferrara S.D. *Doping Antidoping*. Ed. Piccin Nuova Libreria – Padova 2004.

Ferrara SD, Brusini G, Maietti S, Frison G, Castagna F, et al. Proficiency testing for psychoactive substances in Italy. Int. J Legal Med 1999; 113: 50-4

Ferrara SD. *Il laboratorio di farmacologia e tossicologia clinica* C.G. Ed. Medico Scientifiche - Torino 1989.

- Flanagan RJ., Connally G. *Interpretation of analytical toxicology results in life and at postmortem*. Toxicol. Rev. 2005; 24: 51-62.
- Flanagan RJ., Connally G. *Interpretation of analytical toxicology results in life and at postmortem*. Toxicol. Rev. 2005; 24: 51-62.
- Fred W. McLafferty, *Guida alla interpretazione degli spettri di massa*, 1^a ed., Milano, Tamburini Editore, 1972.
- Fucci N., De Giovanni N., Chiarotti M. *Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique*. Forensic Sci Int 2003; 134: 40-45.
- G. Edelman, *Seconda natura. Scienza del cervello e conoscenza umana*, Cortina, Milano 2007, pp. 26-27
- Haleem J. Issaq*, Thomas P. Conrads, George M. Janini, Timothy D. Veenstra, *Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides*, Analytical Chemistry Laboratory, SAIC Frederick NCI-Frederick, Frederick, MD, USA. *Electrophoresis* 2002, 23, 3048–3061. Article first published online: 2 SEP 2002
- Hardman JG., Limbird LE., Molinoff PB., Ruddon RW., Goodman Gilman A. *Le basi farmacologiche della terapia*. Ed. McGraw-Hill Milano 1997.
- http://amsdottorato.cib.unibo.it/304/1/Parisi_tesi.pdf, : *Sviluppo ed applicazione di metodologie di spettrometria di massa nello studio di macromolecole di interesse biologico*. Tesi di Dottorato di Daniela Parisi. Relatore: Chiar.mo Prof. P. Reschiglian. Responsabile scientifico: Chiar.mo Prof. A. Roda, Gennaio 2004 – Dicembre 2006. Introduzione Cap. I.
- http://aperto.unito.it/bitstream/2318/478/1/tesi_laurea_fulltext.pdf. : Univ. Degli studi di Torino, CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN CHIMICA CLINICA, FORENSE E DELLO SPORT_Tesi di Laurea Specialistica: *Sviluppo e validazione di un metodo di prova per la determinazione di Amprolium in alimenti ad uso zootecnico* Relatore: Prof. Marco Vincenti, Controrelatore: Prof. Claudio Baggiani Candidata: Giuseppina Amato. Pag. 41, 6.3: Limite di rivelazione o di identificazione (LOD). “Ove è possibile la valutazione strumentale del rumore di fondo, il LOD viene calcolato come la concentrazione teorica calcolata a partire dal triplo della deviazione standard del rumore di fondo per le determinazioni del bianco, da cui si risale alla concentrazione teorica attraverso la retta di taratura. Dallo schema analitico seguito, si può risalire alla quantità minima di analita nel campione. Il LOD può esser calcolato utilizzando i cromatogrammi delle prove di specificità. È spesso utile riverificare sperimentalmente a posteriori i LOD teorici. È stato determinato anzitutto il rumore di fondo relativo a ciascuna prova effettuata. Nel caso di metodi HPLC, la valutazione del rumore di fondo va fatta in un intervallo di tempo Δt pari a $\Delta t = t_{analita} \pm 2.5\% t_{analita}$. È stato calcolato il valore medio del rumore di fondo (M) e lo scarto tipo (s), quindi è stato ricavato il valore della risposta strumentale (B) corrispondente al LOD mediante la seguente formula: $B = M + 3 s$. Il valore del LOD in concentrazione è stato ottenuto per confronto con la curva di taratura altezza segnale vs. concentrazione corrispondente in matrice, ed è stata espressa come concentrazione dell'analita per unità di matrice.”

http://biotecnologie.unipg.it/docs/2011-2012/ProteomicaMaterialeDidattico/Tecniche_di_spettrometria_di_massa.pdf.

http://cgs.unipv.it/file_pdf/didatticamelleriotot.pdf.

<http://chemweb.ucc.ie/mass%20spec/MS%20summary.pdf>. p. 2. Trad. d.r.

<http://clas.ucdenver.edu/sasl/Instrumentation/Organic/LCMS/LC%20Training/05%20Quadrupole%20Scan%20Modes.pdf>. , 5.3, p. 7.

http://en.wikipedia.org/wiki/AM-1221#cite_ref-3. Vedi anche: Manera, C, Tuccinardi, T; Martinelli, A (2008). . "Indoli e composti correlati come leganti cannabinoidi " *Indoles and related compounds as cannabinoid ligands* ". Altre recensioni Mini in chimica farmaceutica **8** (4): 370-87.

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2008:326:0007:0025:it>: PDF. INFORMAZIONI PROVENIENTI DALLE ISTITUZIONI E DAGLI ORGANI DELL'UNIONE EUROPEA. CONSIGLIO: Piano d'azione dell'UE in materia di lotta contro la droga (2009-2012) (2008/C 326/09). 20.12.2

http://europe.appliedbiosystems.com/europe/biosystems/pdf/iss9/biosol_iss9_quantitation.pdf.

http://gauravtrivedi.weebly.com/uploads/5/5/8/0/5580973/api_4000_course.pdf.

http://it.wikipedia.org/wiki/Cromatogramma_di_massa

<http://it.wikipedia.org/wiki/File:Photomultipliertube.svg>.

<http://it.wikipedia.org/wiki/MALDI>.

http://it.wikipedia.org/wiki/Pagina_principale.

<http://people.unica.it/michelabegala/files/2010/06/MS-Lezione-III-analizzatori.pdf>. diap. 25/44.

<http://people.unica.it/michelabegala/files/2010/06/MS-Lezione-III-analizzatori.pdf>.

<http://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id...> A.A.2012-13, 13.1, p. 8.

<http://people.unipmn.it/marsano/images/Appunti%20corso%202012.pdf>, p. 1.

<http://people.unipmn.it/marsano/images/Appunti%20corso%202012.pdf>.

http://prevenzioneoggi.ispesl.it/pdf%5Cfoc2007_03_1_en.pdf. "The most frequently observed phenomenon is ion suppression, which is caused by a change in the spray droplet solution properties in the presence of non- or less-volatile solutes etc." Giovanna Tranfo, Aldo Marco Cialdella, Enrico Paci, Daniela Pigni, Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (ISPESL) Dipartimento di Igiene del Lavoro; Monte Porzio, Focus Vol. 3, n. 3, pp. 61-69, *L'effetto Matrice nella determinazione degli indicatori di esposizione professionale, mediante HPCL/MS/MS.*, Op. cit., p. 59. Vedi a proposito Thomas M. Annesley. Ion Suppression in Mass Spectrometry. Clin Chem 2003;49(7):1041-4, rip. nell'articolo.

<http://road.unimol.it/bitstream/2192/31/1/tesi%20dottorato%20Dr.%20Ivan%20Notardonato.pdf>. Università degli Studi del Molise, Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali dottorato di ricerca in Biochimica e Chimica Applicate, SVILUPPO DI METODI ANALITICI PER DETERMINAZIONI AFFIDABILI IN CAMPO AMBIENTALE ED ALIMENTARE Coordinatore Ch.mo prof. S. Passarella,

Tutor Ch.mo prof. M.V. Russo, *Dottorando* Dr. Ivan Notardonato XXII CICLO. Dall'inglese *hyphenated* significa due tecniche i cui nomi va sempre legati con un trattino: es. GC/MS.

<http://shop.perkinelmer.com/Content/Images/2006/SFDC>.

http://w3.uniroma1.it/biocmed2/elettive/Cromatografia_TDM.pdf.

http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:vnvaE2cqKJoJ:www.fedoa.unina.it/815/1/tesi_di_dottorato_tartaglione.pdf+&cd=1&hl=it&ct=clnk&gl=it.

http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:vnvaE2cqKJoJ:www.fedoa.unina.it/815/1/tesi_di_dottorato_tartaglione.pdf+&cd=1&hl=it&ct=clnk&gl=it, pp. 17-21.

<http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/4000-api-hardware-guide.pdf>, 40/110.

http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/mass-spectrometry-cms_041968.pdf.

http://www.biotechnologiepertutti.it/?page_id=90.

http://www.biotechnologiepertutti.it/?page_id=90: Le principali cromatografie disponibili sono quella a Scambio anionico (forte e debole), a Scambio cationico (forte e debole), quella d'Affinità per metalli (Ni, Cu, Zn, Cu, Ga), e le Cromatografie idrofobiche.

http://www.cedostar.it/documenti/corso_marcatori_sostanze_abuso_arezze_test_cromatografici_corezzi.pdf

http://www.cedostar.it/documenti/corso_marcatori_sostanze_abuso_arezze_test_cromatografici_corezzi.pdf.

<http://www.chimica-online.it/download/cromatografia-su-carta.htm>.

<http://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id...> A.A.2012-13, 13.1, p. 3.

<http://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id...> A.A.2012-13, 13.1, p. 6.

<http://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id...> A.A.2012-13, 13.1, p. 8.

http://www.fedoa.unina.it/1709/1/Castiglia_Ambiente_Prevenzione_e_Medicina_Pubblica.pdf, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dottorato di ricerca in ambiente, prevenzione e medicina pubblica (XX ciclo) Coordinatore Prof. Claudio Buccelli, Indirizzo Scienze Biologiche Forensi, Tecniche di Spettrometria di massa nella ricerca di sostanze stupefacenti ed in particolare delle "NEW CLUB DRUGS". Tesi di Dottorato Tutor Ch.mo Prof. Antonio Acampora, Dottoranda Loredana Castiglia Anno 2006-2007.

http://www.fedoa.unina.it/1709/1/Castiglia_Ambiente_Prevenzione_e_Medicina_Pubblica.pdf.

DOTTORATO DI RICERCA IN AMBIENTE, PREVENZIONE E MEDICINA PUBBLICA (XX ciclo) Coordinatore Prof. Claudio Buccelli, INDIRIZZO SCIENZE BIOLOGICHE FORENSI, TECNICHE DI SPETTROMETRIA DI MASSA NELLA RICERCA DI SOSTANZE STUPEFACENTI ED IN PARTICOLARE DELLE "NEW CLUB DRUGS" Tesi di Dottorato, Loredana Castiglia, Anno 2006-2007, pp. 47-48.

http://www.fedoa.unina.it/1709/1/Castiglia_Ambiente_Prevenzione_e_Medicina_Pubblica.pdf.

DOTTORATO DI RICERCA IN AMBIENTE, PREVENZIONE E MEDICINA PUBBLICA (XX ciclo) Coordinatore Prof. Claudio Buccelli, INDIRIZZO SCIENZE BIOLOGICHE FORENSI, TECNICHE DI SPETTROMETRIA DI MASSA NELLA RICERCA DI SOSTANZE

STUPEFACENTI ED IN PARTICOLARE DELLE “NEW CLUB DRUGS” Tesi di Dottorato, Loredana Castiglia, Anno 2006-2007, pp. 47-48. , p. 48.

http://www.fedoa.unina.it/1709/1/Castiglia_Ambiente_Prevenzione_e_Medicina_Pubblica.pdf. p. 58.

http://www.fedoa.unina.it/815/1/tesi_di_dottorato_tartaglione.pdf: *ANALISI DI BIOTOSSINE MARINE etc.* XVIII CICLO 2002-2005, Op. cit., Cap. 1.1.1. , pp. 7-8.

http://www.fedoa.unina.it/815/1/tesi_di_dottorato_tartaglione.pdf: *ANALISI DI BIOTOSSINE MARINE IN MITILI DEL MAR MEDITERRANEO E DEI LORO ORGANISMI PRODUTTORI*”; TUTORE: CH. MO PROF. ERNESTO FATTORUSSO, CANDIDATA: LUCIANA TARTAGLIONE. DOTTORATO DI RICERCA IN “SCIENZA DEL FARMACO” XVIII CICLO 2002-2005, Cap. 1.1.1.

http://www.fedoa.unina.it/815/1/tesi_di_dottorato_tartaglione.pdf: *ANALISI DI BIOTOSSINE MARINE IN MITILI DEL MAR MEDITERRANEO E DEI LORO ORGANISMI PRODUTTORI*”; TUTORE: CH. MO PROF. ERNESTO FATTORUSSO, CANDIDATA: LUCIANA TARTAGLIONE. DOTTORATO DI RICERCA IN “SCIENZA DEL FARMACO” XVIII CICLO 2002-2005

http://www.laurea-online-roma.it/info_uniecampus_roma.asp?utm_source=Google&utm_medium=Adv&utm_term=Ecampus.Roma&utm_content=display&utm_campaign=1305.MagliaVerde&idm=112314&gclid=CLDr6oD_oLkCFYKS3godLzIAgg

http://www.masterms.it/e107_files/public/pres._crom_agozzino_1.ppt#350,12, Diapositiva 13.

<http://www.masterms.it/e107files/public/2-Gli%20Approcci%20Proteomici.pdf>.

http://www.nserc-crsng.gc.ca/_doc/Reports-Rapports/resbus_e.pdf. “MDS Sciex was incorporated in 1974 by a group of researchers headed by Dr. Barry French at the Institute of Aerospace Studies of the University of Toronto. Dr. French, now retired from academic life, has been supported by NSERC Discovery, and Research Tools and Instruments Grants for his research into the detection of trace substances.”

http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_3146_listaFile_itemName_17_file.pdf: Ministero della Salute, Attività di Polizia Sanitaria, Roma, 21-22 giugno 2012, *Nuove sostanze stupefacenti*, pp. 6 e 7.

<http://www.sapere.it/enciclopedia/elettrocromatograf%C3%ACa.html>

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/10440305>

<http://www.skuola.net/materiale-universita/9797-gascromatografia.pdf>. diap. 21/26.

http://www.smauro.it/classi2009_10/cromatografia%204/cromatogramma_VAN%20DEEMTER.pdf.

<http://www.unipa.it/~dctfpal/camardaanalisiIII/gascromatografia.doc>.

<http://www.uniurb.it/biotecnologie/didattica/docenti/documents/HPLC.pdf>. n. 2/45.

<http://www.uniurb.it/MedChem/Gatti/massa.doc>

[http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20\(metodi%20separazione-cromatografia\).pdf](http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20(metodi%20separazione-cromatografia).pdf). Modificato.

[http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20\(metodi%20separazione-cromatografia\).pdf](http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20(metodi%20separazione-cromatografia).pdf).

[http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20\(metodi%20separazione-cromatografia\).pdf](http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20(metodi%20separazione-cromatografia).pdf)

[http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20\(metodi%20separazione-cromatografia\).pdf](http://www2.unibas.it/armentano/linked/lezione%203%20(metodi%20separazione-cromatografia).pdf)

<https://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id.>

<https://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id=341702>, pp. 21-3 segg.-

<https://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id....>

<https://www.google.it/search?q=immagini+di+intercetta+e+pendenza+nella+curve+di+calibrazioni+analitiche>

.

Hunt, D.F.; Shabanowitz, J. III; Yates, J.R. 3rd; Zhu, N.Z., Russell D.H.. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1987**, 84,620–23.

IE5\E5RLYQ0S\TECNICHE IFENATE GC_MS e LC_MS_2012.pdf, p. 40/134.

Kintz P., Samyn N. *Use of alternative specimens: drugs of abuse in saliva and doping agents in hair*. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 239-46.

La cella di collisione utilizza l'accelerazione assiale lineare per raggiungere una frammentazione MS/MS molto veloce, senza effetti memoria tra gli esperimenti. Inoltre, mantiene un'ottima sensibilità anche con *dwell time* [tempo di sosta o di permanenza] di cinque millisecondi permettendo misurazioni anche sui picchi cromatografici più sottili. Vedi http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5989-4894_ITE.pdf

Lodi F., Marozzi E. *Tossicologia forense e chimica tossicologica* Ed. Libreria Cortina - Milano 1982; Bertol E., Lodi F., Mari F., Marozzi E. *Trattato di tossicologia Forense* Ed. CEDAM - Padova 1994.

MacLafferty FW. Tandem mass spectrometry. *Science*. 1981; 214: 280

Maurer HH. *Screening procedures for simultaneous detection of several drug classes used for high throughput toxicological analyses and doping control*. *Comb Chem High Throughput Screen* 2002; 6: 467-80

Module 3 Théorie A Support Specialist Approach, diap. 100/146, AB Applied Biosystems 2006. Advanced Instrument Optimisation and Theory in LC-MS/MS Quantitation. MDS SCIEX.

Module 3 Théorie A Support Specialist Approach, diap. 119/146, AB Applied Biosystems 2006. Advanced Instrument Optimisation and Theory in LC-MS/MS Quantitation. MDS SCIEX.

Module 3 Théorie A Support Specialist Approach, diap. 18 e 54/146, AB Applied Biosystems 2006. Advanced Instrument Optimisation and Theory in LC-MS/MS Quantitation. MDS SCIEX.

Moeller MR., Kraemer T. *Drugs of abuse monitoring in blood for control of driving under the influence of drugs*. *Ther Drug Monit* 2002;24:210-21. Review.

Quality Commission of Italian Toxicology Forensic Group. Guidelines of the laboratories of abuse drug analysis for forensic purposes; 2008.

Robert M. Silverstein; Francis X. Webster, David J. Kiemle, *Identificazione spettrometrica di composti organici*, 2^a ed., Milano, Casa Editrice Ambrosiana, giugno 2006.

Roberto G. Lucchini, Alessandro Porro, *Sviluppo della neuro tossicologia comportamentale nell'ultimo secolo e le sue radici storiche*, *G. Ital. Di Medicina del Lavoro, Erg* 2011; 33:3, Suppl. 475-478. <http://gimle.fsm.it>. © PI-ME. Pavia 2011.

- Samyn N., De Boeck G., Verstraete AG. *The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers*. J Forensic Sci 2002; 47:1380-7. Kidwell DA., Holland JC., Athanaselis S. *Testing for drugs of abuse in saliva and sweat*. J. Chromatogr. B., 1998; 713: 111-35
- Scarlata S., Chiarotti M., Fucci N., De Giovanni N. *Haematic concentrations versus oral doses of methadone* 2001; Guerrini F., Ceppellini C., Resentini M. *Valutazione dei dosaggi di buprenorfina sublinguale in relazione alla storia pregressa di assunzione di eroina e/o metadone: ricerca di un fattore predittivo di performance terapeutica*. Boll Farmacodip Alcoolis 2002.
- Scientific Section Division for Operations and Analysis. *Rapid on-site screening of drugs of abuse of United Nations International Drug Control Programme*; Vienna, 2001
- Skoog D.A., West D. M, Holler F.J., *Chimica Analitica, una introduzione*, EdiSES S.r.l., Napoli 1996, III ed., Cap. 26, pp. 51
- Skoog D.A., West D. M, Holler F.J., *Chimica Analitica, una introduzione*, EdiSES S.r.l., Napoli 1996, III ed., Cap. 26, pp.516-517
- Skoog D.A., West D. M, Holler F.J., *Chimica Analitica, una introduzione*, EdiSES S.r.l., Napoli 1996, III ed., p.525
- Skoog D.A., West D. M, Holler F.J., *Chimica Analitica, una introduzione*, EdiSES S.r.l., Napoli 1996, III ed., Cap. 26, pp. 517.
- Skoog D.A., West D. M, Holler F.J., *Chimica Analitica, una introduzione*, EdiSES S.r.l., III ed., Napoli 1996. p 558, Tab. 27-5.
- Università degli Studi della Tuscia, Viterbo, Facoltà di Agraria, Dottorato di ricerca; Biotecnologia degli alimenti XXI ciclo: *Recupero di antiossidanti naturali dai sottoprodotti dell'industria agroalimentare: noccioli di oliva (Olea Europaea L), gusci e perisperma di nocciole (Corylus Avellana L)*, AGR 15. Coordinatore: Prof. Marco Esti; Tutor Dott.ssa Marina Contini. Dottorando Simone Baccelloni, fig. 50. http://dspace.unitus.it/bitstream/2067/1048/1/sbaccelloni_tesi_d.pdf.
- Università della Tuscia, Viterbo, Dipartimento di Scienze Ambientali, Dottorato in ricerca di “Genetica e biologia cellulare”, XVIII ciclo; “*Proteomica come piattaforma di indagine dalle molteplici potenzialità applicative*”. Coordinatore Prof. Luigi Bosco, Docente guida: Prof. Lelio Zolla, Dottorando: Corrado Ciambella., cap. 2, p. 33.
- users.unimi.it/stefaniavilla/gas_cromatografia%20S.Villa%2016.1.08.ppt., diapositiva 16/62.
- Vandevenne M., Vandebussche H., Verstraete A., *Detection time of drugs of abuse in urine*. Acta Clin Belg. 2000; 55: 323-33. Review.
- Verstraete AG. *Detection times of drugs of abuse in blood, urine and oral fluid*. Ther Drug Monit 2004; 26: 200-205.
- Villain M., Cirimele V., Kintz P. *Hair analysis in toxicology*. Clin Chem Lab Med. 2004; 42:1265-72. Review
- Volkow ND, Fowler JS, *Addiction, a disease of compulsion and drive; involvement of the orbitofrontale cortex*. Cerebral Cortex, 2000 Mar; 10(3):318-25. Review.
- Watson Jt. *Introduction to mass spectrometry*. Raven Press New York 1985 II edizione.

zeolite s. f. [comp. del gr. ζέω «bollire» e –lithos (pietra)]. – Nome generico di una famiglia di minerali di origine secondaria, per lo più monoclini o rombici, di colore chiaro, chimicamente costituiti da allumosilicati idrati di uno o più elementi alcalini o alcalino-terrosi. Da <http://www.treccani.it/vocabolario/tag/zeolita/>.

Zuccaro P., Pichini S., Altieri I., Pacifici P. - *Proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici* – Rapporti ISTISAN 96/29 (1996) 26-36.

GLOSSARIO

Precisione: Il grado di approssimazione del valore determinato al valore nominale o alle note reali nelle condizioni prescritte. Questo è talvolta chiamato veridicità.

Analita: Una sostanza chimica specifica da misurare, che può essere farmaco intatto, biomolecola o suo derivato, metabolita, e / o prodotto di degradazione in una matrice biologica.

Banco (Batch o iter di prova o corsa o sessione di analisi): Un set completo di analisi e campioni di studio con un numero adeguato di standard e QC per la loro convalida. Gestisce diversi set (o lotti) e può essere completato in un giorno; oppure un iter (o **batch** o banco) può richiedere diversi giorni per essere completato.

Matrice biologica: Una discreta quantità di materiale di origine biologica che può essere campionata e processata in un modo riproducibile. Esempi sono il sangue, siero, plasma, urina, feci, saliva, espettorato, capelli e vari tessuti in discreta quantità.

Taratura standard: Una matrice biologica in cui una quantità nota di analita è stato aggiunto o risultare quella di spicco. Standard di taratura vengono usati per costruire curve di calibrazione da cui vengono determinate le concentrazioni di analiti in campioni QC e quelli in studio sconosciuti.

Standard interno: composto di prova (s) (ad esempio, un analogo strutturalmente simile, purché sia un composto etichettato come stabile)

aggiunto ad entrambi gli standard di calibrazione e i campioni a concentrazione nota e costante per facilitare la quantificazione dell'analita bersaglio (s).

Limite di rilevabilità (LOD): La più bassa concentrazione di un analita che la procedura bioanalitica possa differenziare in modo attendibile dal “rumore” di fondo.

Limite inferiore di quantificazione (LLOQ): La minima quantità di un analita in un campione che può essere quantitativamente determinata con precisione e accuratezza adatte.

Effetto matrice: L'alterazione diretta o indiretta o interferenza in risposta a causa della presenza di analiti impreviste (per analisi) o altre sostanze interferenti nel campione.

Metodo: Una descrizione completa di tutte le procedure utilizzate in analisi del campione.

Precisione: grado di concordanza (grado di dispersione) tra una serie di misurazioni ottenute dal campionamento multiplo dello stesso campione omogeneo nelle condizioni prescritte.

Trattati (Processati): L'estratto finale (prima dell'analisi strumentale) di un campione che è stato sottoposto a manipolazioni diverse (ad esempio, l'estrazione, la diluizione, la concentrazione).

Gamma (Range) di Quantificazione: L'intervallo di concentrazione compreso ULOQ e LLOQ, che può essere affidabile e riproducibile, quantificato con accuratezza e precisione attraverso l'uso del rapporto tra concentrazione e risposta.

Recupero: L'efficienza di estrazione di un processo analitico, riportato come percentuale della nota quantità di un analita, effettuata attraverso l'estrazione di un campione e i vari gradi del metodo.

Riproducibilità: La precisione tra due laboratori. Rappresenta anche la precisione del metodo sotto le stesse condizioni operative in un breve periodo di tempo.

Campione: Un generico termine che comprende controlli, spazi, incognite, e campioni trattati, come descritto di seguito:

Bianco: Un campione di una matrice biologica a cui non sono stati aggiunti analiti che viene utilizzato per valutare la specificità del metodo bioanalitico.

Campione di Controllo Qualità(QC): Un campione addizionato utilizzato per monitorare le prestazioni di un metodo bioanalitico e per valutare l'integrità e la validità dei risultati di campioni "sconosciuti" analizzati in un singolo lotto.

Sconosciuto: Un campione biologico che è soggetto all'analisi.

Selettività: La capacità del metodo bioanalitico nel misurare e differenziare analiti in presenza di componenti che possono prevedibilmente essere presenti. Si potrebbe trattare di metaboliti, impurità, degradanti, o componenti della matrice.

Stabilità: La stabilità chimica di un analita in una matrice secondo particolari condizioni di tempo dato ad intervalli.

Cromatogramma: E' il tracciato che descrive l'andamento del segnale del rivelatore in funzione del tempo o del volume di eluente a partire dall'istante in cui la miscela viene introdotta nella colonna. Al passaggio del solo eluente (o del gas di trasporto "carrier") il segnale è bassissimo, quindi avremo la linea di base. Al passaggio delle sostanze in esame il segnale amplificato ed il tracciato si inclina, raggiunge un massimo e ritorna alla linea di base.

Curva Standard: Il rapporto tra il valore di risposta sperimentale e di concentrazione analitica (chiamato anche *una curva di calibrazione*).

Sistema di idoneità: Determinazione delle prestazioni dello strumento (ad esempio, la sensibilità e la ritenzione cromatografica) attraverso l'analisi di uno standard di riferimento prima di ammetterlo al batch (banco) analitico.

Limite superiore di quantificazione (ULOQ): La massima quantità di un analita in un campione che può essere quantitativamente determinato con precisione e accuratezza.

Validazione:

Validazione Completa , ovvero: stabilimento di tutti i parametri di convalida da applicare all'analisi del campione per il metodo bio analitico e per ciascun analita.

Validazione Parziale : Modifica di metodi di validazione bioanalitica che non si richiedono necessariamente per il rinnovo completo.

Validazione incrociata: parametri di confronto tra due metodi bioanalitici di validazione.

Appendice

Guida alla Validazione con metodo bio-analitico

La presente trascrizione è una traduzione di una nota *Guida*, da me compiuta con lo scopo di apprendere all'inizio di questo studio; pur commentandola liberamente e adattando alla nostra lingua alcuni termini, ho cercato di restare fedele al contenuto:

Si tratta della "Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation" *U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001 BP.*

Acronimi base e Sigle

Per gli analiti considerati:

Δ9-THC Δ9-TETRAIDROCANNABINOLO

THCCOOH ACIDO TETRAIDROCANNABINOLO

THCCOOH d9 ACIDO TETRAIDROCANNABINOLO DEUTERATO

COC COCAINA

BE BENZOILECGONONA

EME ECGONINAMETILESTERE

MOR MORFINA

Per le tecniche:

L/L LIQUIDO/LIQUIDO

GC GAS CROMATOGRAFIA

HPLC HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI

MS MASS SPECTROMETRY, SPETTROMETRIA DIMASSA

TIC TOTAL ION CURRENT, CORRENTE IONICA TOTALE

SIM SELECTED ION MONITORING, SCANSIONE DI IONI SELEZIONATI

MS-MS SPETTROMETRIA DIMASSA TANDEM

MSN SPETTROMETRIA DIMASSA MULTISTADIO

MS-MS(SRM) TANDEM MASS SPECTROMETRY WITH SELECTED REACTION MONITORING,
SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM CON REGISTRAZIONE DI UNA REAZIONE SELEZIONATA
EI ELECTRONIC IONIZATION, IONIZZAZIONE ELETTRONICA
GC/MS GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA
GC/MS-MS GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM
LC/MS Cromatografia Liquida/Spettrometria di Massa
R² COEFFICIENTE DI DETERMINAZIONE
DS% DEVIAZIONE STANDARD PERCENTUALE
%DIFF COEFFICIENTE DI INACCURATEZZA PERCENTUALE
CV% COEFFICIENTE DI VARIAZIONE PERCENTUALE⁶

⁶ Vedi http://www.fedoa.unina.it/1709/1/Castiglia_Ambiente_Prevenzione_e_Medicina_Pubblica.pdf

I. INTRODUZIONE

Questa guida fornisce assistenza agli sponsor di applicazioni sperimentali di nuovi farmaci (IND), nuovi applicazioni di farmaci (NDA), applicazioni abbreviate di farmaci nuovi (ANDAs), e supplementi nello sviluppare in senso bio-analitico informazioni sulla validazione del metodo⁷ utilizzato in farmacologia clinica umana, in biodisponibilità (BA)⁸, e in bioequivalenza (BE)⁹ che richiedono studi di farmacocinetica (PK)¹⁰ di valutazione.

Questa guida vale anche per i metodi utilizzati per studi bioanalitici in farmacologia non umana / studi tossicologici e studi preclinici. Per gli studi relativi al processo di approvazione dei farmaci veterinari, questa disposizione si applica solo a BA (biodisponibilità) nel sangue e nelle urine, BE (bioequivalenza), e studi di farmacocinetica.

Le informazioni contenute in questa guida si applica in generale alle procedure bio-analitiche come la gas-cromatografia (GC)¹¹, la cromatografia liquida ad alta pressione (LC), la cromatografia su carta e tecniche combinate GC e LC; alla spettrometria di massa (MS) e altre quali la LC-MS (cromatografia liquida ad alta pressione e spettrometria di massa), LC-MS-MS (*cromatografia liquida accoppiata in tandem con la spettrometria di massa*), GC-MS e GC-MS-MS¹² effettuata per la determinazione quantitativa di farmaci e / o metaboliti in matrici biologiche come sangue, siero,

⁷ Nel presente lavoro il termine “validazione” è sinonimo di “convalida”.

⁸ Biodisponibilità: Quantità di farmaco che passa nella circolazione generale dopo somministrazione per qualsiasi via (*Goodman & Gilman, 11 Ed; EMEA 26 July 2001*) Cfr. <http://www.ausl.fe.it/home-page/news/allegati-news/2008/antonelli.pdf>

⁹ Cfr. http://www.asl.pavia.it/FORMAZIONE/bioequivalenza/LinkedDocuments/Caputi_Catania_Equivalenti_e_pregiudizio_2010_AS_L_PV.pdf. Due equivalenti farmaceutici le cui velocità ed entità di assorbimento non differiscono statisticamente quando essi sono somministrati alla stessa dose e in condizioni sperimentali simili sono definiti *Bioequivalenti*. Nell'analisi per la bioequivalenza il range di diversità che si può avere nelle curve concentrazione/tempo in seguito all'assunzione di due unità posologiche dello stesso farmaco, somministrate a due differenti soggetti è del $\pm 20\%$, ossia compreso tra 80-125% *questi limiti sono asimmetrici a causa della trasformazione logaritmica dei dati impiegati per la comparazione.

¹⁰ Cfr. Farmacocinetica (PK): studia la cinetica dei processi responsabili della variazione temporale dei livelli dei composti esogeni nell'organismo.

http://www.uniurb.it/biotecnologie/didattica/docenti/documents/IVFarmacocinetica_Farmacodinamica.pdf

¹¹ Cfr. http://www.cedostar.it/documenti/corso_marcatori_sostanze_abuso_arezzi_test_cromatografici_corezzi.pdf. La cromatografia è una tecnica di separazione. Viene accoppiata con una tecnica di rivelazione (spettrofotometrica o spettrometrica MS). Il grande passo avanti è avere un rivelatore capace di fare uno SCAN completo della molecola in uscita dalla colonna in modo da non “confonderla” più con altre. Nei rivelatori 3D, lo spettro della sostanza aggiunge al cromatogramma una vera e propria 3a dimensione. Invece, nel caso di Rivelatore a FOTODIODI Diode Array Detector (DAD), (REMEDI BIORAD) il detector esegue uno SPETTRO UV della sostanza in uscita dalla colonna. Il rivelatore MS è il “gold standard”. Inizialmente è stato utilizzato come rivelatore di Gas cromatografia (GC-MS). In GC le molecole “viaggiano” nella colonna ed escono da questa in fase vapore. Questo rende più facile la ionizzazione che avviene ad alto vuoto. L'interfacciamento con la cromatografia liquida (HPLC o LC) è più recente (LC-MS).

¹² Cfr. Ibidem: GC-MS/MS: La *Ionizzazione Elettronica* è una tecnica di ionizzazione “hard” perché ad alta Energia (provoca estesa frammentazione nella maggior parte delle molecole). Lo step di frammentazione può essere comunque ripetuto per ottenere “frammenti di frammenti” MS/MS o MS TANDEM. In teoria si può concepire un esperimento di MS n volte. Vedi paragrafo dedicato, nelle pagine seguenti.

plasma o urina. La guida vale anche per altri metodi bio-analitici, come procedure immunologiche e microbiologiche, e ad altre matrici biologiche, come tessuti e campioni di pelle.

Essa fornisce raccomandazioni generali per la convalida del metodo bio-analitico. Le raccomandazioni possono essere regolate o modificate a seconda del tipo specifico di metodo analitico utilizzato.

II. PARAMETRI FONDAMENTALI

La presente guida è stata sviluppata sulla base delle deliberazioni di due percorsi laboratoristici: (1) **Validazione dei Metodi analitici**: biodisponibilità, studi di bioequivalenza, e farmacocinetiche (svoltasi nel dicembre 1990) e (2) **la validazione dei metodi Bioanalitici , cioè una rivisitazione dopo un decennio di progressi** (tenutasi il 12 gennaio 2000).

I Metodi analitici selettivi e sensibili per la valutazione quantitativa dei farmaci e dei loro metaboliti (analiti) sono fondamentali per il successo delle fasi pre-clinica e / o di biofarmaceutica e di studi di farmacologia clinica. Una validazione del metodo bioanalitico include tutte le procedure che dimostrano che un particolare metodo utilizzato per la misurazione quantitativa di analiti in una data matrice biologica, come sangue, plasma, siero o urina, è affidabile e riproducibile per l'uso previsto.

I parametri fondamentali per la validazione comprendono (1) la accuratezza, (2) la precisione, (3) la selettività, (4) la sensibilità, (5) la riproducibilità, e (6) la stabilità. La validazione comporta di documentare, attraverso l'uso di specifiche indagini di laboratorio, che le prestazioni del metodo sono adatte ed affidabili per le applicazioni previste analitiche. L'accettabilità dei dati analitici corrisponde direttamente ai criteri utilizzati per validare il metodo.

I Metodi pubblicati di analisi sono spesso modificati per soddisfare i requisiti del laboratorio che esegue il test. Tali modifiche devono essere validate per garantire adeguate prestazioni del metodo analitico. Quando vengono apportate modifiche a un metodo precedentemente validato, l'analista dovrebbe decidersi a giudicare necessarie un certo numero di validazioni supplementari. Nel corso di un programma di sviluppo di farmaci tipico, un metodo definito bioanalitico subisce molte modifiche. I cambiamenti evolutivi per sostenere studi specifici a diversi livelli di validazione dimostrano la validità dei risultati di un test. Diversi tipi e livelli di validazione sono definiti e caratterizzati come segue:

A. validazione completa

- la validazione completa è importante nello sviluppo e implementazione di un metodo bioanalitico per la prima volta.

- Essa è importante per riconoscere l'entità del nuovo farmaco.
- una completa validazione del campione riveduto è importante se vengono aggiunti altri metaboliti ad un test già esistente per la quantificazione.

B. validazione parziale

•Le validazioni parziali sono modifiche di metodi bioanalitici già validati. La validazione parziale può variare dal riscontro di un minimo di accuratezza e precisione fino alla quasi completa ripetizione della validazione. Tipici cambiamenti del metodo bioanalitico che rientrano in questa categoria includono, ma non sono limitati a questi:

- Trasferimenti del metodo bioanalitico tra laboratori o analisti
- Variazione della metodologia di analisi (ad esempio, modifica dei sistemi di rilevamento)
- Variazione anticoagulante nella raccolta di un fluido biologico
- Variazione della matrice all'interno della specie (ad esempio, da plasma umano ad urina umana)
- Variazione nelle procedure di elaborazione del campione
- Variazione della specie all'interno della matrice (ad esempio, dal plasma di ratto al plasma di topo)
- Variazione in una rilevante gamma di concentrazione
- Variazione strumenti e / o piattaforme software
- volume del campione limitato (per esempio, lo studio pediatrico)
- matrici rare
- dimostrazione della selettività di un analita in presenza di farmaci concomitanti
- dimostrazione della selettività di un analita in presenza di metaboliti specifici

C. validazione crociata

•La validazione crociata è un confronto di parametri di validazione quando due o più metodi bioanalitici sono utilizzati per generare dati all'interno dello stesso studio o attraverso studi differenti. Un esempio di validazione crociata sarebbe una situazione in cui un originale metodo bioanalitico già validato funge da riferimento e il metodo di revisione bioanalitica ne è il paradigma. I confronti devono essere fatti in entrambi i modi.

Quando l'analisi dei campioni all'interno di un singolo studio sono condotte in più di un luogo o in più laboratori, la validazione crociata con gli standard matrice a spillo e i campioni in oggetto deve essere condotta in ogni sito o in ciascun laboratorio per stabilirne l'affidabilità. La validazione crociata dovrebbe essere effettuata qualora i dati generati utilizzando differenti tecniche analitiche (ad esempio, LC-MS-MS vs ELISA) in diversi studi, sono inclusi in una sequenza regolamentata. Tutte le modifiche dovrebbero essere valutate per determinare il grado consigliato di validazione. Il laboratorio di analisi che volesse condurre studi di farmacologia / tossicologia e altri studi pre-clinici

per la sequenza regolamentata dovrebbe aderire a *Laboratory Good Practices* pratiche FDA di laboratorio (GLP) e (21 CFR part 58)¹³ con sani principi di garanzia della qualità in tutto il processo del test¹⁴. Il metodo bioanalitico per la BA(biodisponibilità) umana, BE (bioequivalenza), e PK (farmaco-cinetica), e gli studi di interazione farmacologica devono soddisfare i criteri in 21 CFR 320, 29.¹⁵

Il laboratorio di analisi dovrebbe avere una serie scritta di **procedure operative standard (SOP o POS)** per garantire un sistema completo di controllo della qualità e di garanzia. Le SOP dovrebbe coprire tutti gli aspetti di analisi dal momento del prelievo del campione al suo arrivo in laboratorio finché i risultati delle analisi sono riportati. I POS dovrebbe includere anche libri contabili, la sicurezza e la catena di custodia del campione (sistemi di responsabilità per garantire l'integrità di articoli di prova), la preparazione del campione, le attrezzature per le analisi quali i metodi, i reagenti, le dotazioni, gli strumenti, (le vetrerie, aggiunto d.r.) e procedure per il controllo di qualità e verifica dei risultati.

Il processo attraverso il quale si sviluppa un metodo specifico bioanalitico, validato e utilizzato nella routine di analisi del campione può essere diviso in (1) preparazione di riferimento standard, (2) Sviluppo del Metodo bioanalitico e applicazioni con l'istituzione di una procedura di dosaggio, e (3) di un metodo bioanalitico già validato per l'analisi di routine di droga e criteri di accettazione lungo il percorso dell'analisi e / o di una parte. Questi tre processi sono descritti nelle sezioni seguenti di questa guida.

III. STANDARD DI RIFERIMENTO

L'Analisi dei farmaci e loro metaboliti in una matrice biologica viene effettuata utilizzando campioni addizionati di taratura (di riferimento) standard e utilizzando campioni QC per il controllo della qualità. La purezza dello standard di riferimento utilizzato per la preparazione campioni

¹³ CFR = *Code of Federal Regulations* Title 21. Specificatamente si fa riferimento al Titolo 21: Food and Drug Administration, Chapter 1, Sottocapitolo A- Generalità, Part. 58: *Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies*.

Vedi <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?>.

¹⁴ Cfr. l'originale: to FDA=st. Good Laboratory Practices (GLPs), (21 CFR part 58). Le buone pratiche di laboratorio furono introdotte negli Stati Uniti dalla US Food and Drug Administration (FDA) nel 1976, al fine di assicurare un adeguato controllo sulla qualità degli studi di laboratorio comprovanti la non pericolosità dei prodotti (farmaci, additivi alimentari ecc.) sottoposti a regime autorizzativo.

La regolamentazione per la GLP emanata dalla FDA è stata utilizzata come base per lo sviluppo dei principi di Buona Pratica di Laboratorio da parte dell'OCSE (GLP OCSE, 1979-80, riveduto e aggiornato 1995-96). La normativa in ambito comunitario e nazionale in materia di Buona Pratica di Laboratorio fa riferimento alle norme OCSE. Vedi. http://www3.unict.it/cclsdb/database/materiale/m_178_02GLP.pdf.

¹⁵ Ibidem, Part 29.

arricchiti può influenzare i dati di studio. Per questo motivo, per preparare le soluzioni di concentrazioni note, dovrebbe essere utilizzato uno standard autenticato di riferimento analitico di identità conosciuta e di purezza garantita. Se possibile, lo standard di riferimento dovrebbero identificarsi con l' analita. Quando ciò non è possibile, una formula chimica stabilita (base libera o acido, sale o estere) di purezza nota, può essere egualmente utilizzato.

Tre tipi di standard di riferimento sono di solito utilizzati: (1) gli **standard** di riferimento certificati (ad esempio, USP norme compendiali)¹⁶, (2) gli **standard** di riferimento commercialmente **forniti** che hanno già una buona reputazione dalla sorgente commerciale, e / o (3) gli **altri materiali dalla purezza documentata** sintetizzati appositamente da un laboratorio analitico o altro istituto non-commerciale. Fonte, numero di lotto, data di scadenza, certificati di analisi quando disponibili, e / o - internamente o esternamente- dovrebbero essere fornite per ogni standard di riferimento, prove già pronte d'identità e purezza.

L' *US Pharmacopeia* fu fondata nel 1820; tutte le società di medicina degli States furono invitati ad inviare delegati; 11 hanno partecipato. L' USP ha creato un sistema di standard, un sistema di controllo di qualità (formule), e un formulario nazionale (NP). Solo 217 furono i farmaci che hanno soddisfatto i criteri (ovvero che il loro uso fosse "*più pienamente stabilito e meglio compreso*") e sono stati ammessi.¹⁷

IV. SVILUPPO del Metodo: TEST CHIMICO

Lo sviluppo del metodo e la fase di stabilimento definiscono il test chimico. I fondamentali parametri per la validazione di un metodo bioanalitico sono l'accuratezza, la precisione, la selettività, la sensibilità, la riproducibilità e la stabilità. Le Misure per ciascun analita nella matrice biologica devono essere convalidate. Inoltre, dovrebbe costantemente essere determinata la stabilità dell'analita in campioni arricchiti.

Un tipico sviluppo del metodo e la creazione di un metodo di determinazione bioanalitica include (1) selettività, (2) accuratezza, precisione, recupero, (3) la curva di calibrazione, e (4) la stabilità dell' analita in campioni addizionati.

¹⁶ *The United States Pharmacopeial Convention (USP)*¹⁶ is a scientific nonprofit organization that sets standards for the identity, strength, quality, and purity of medicines, food ingredients, and dietary supplements manufactured, distributed and consumed worldwide. USP's drug standards are enforceable in the United States by the Food and Drug Administration, and these standards are developed and relied upon in more than 140 countries.)

¹⁷ Vedi <http://www.usp.org/about-usp/our-impact/mission-history>: **1820**: U.S. Pharmacopeia founded; all state societies of medicine invited to send delegates; 11 attended. USP created a system of standards, a system of quality control (formulae), and a national formulary. Only 217 drugs that met the criteria of "most fully established and best understood" were admitted.

A. Selettività

La Selettività è la capacità di un metodo analitico di differenziare e quantificare l'analita in presenza di altri componenti nel campione. Per stabilire la selettività, le analisi dei campioni in bianco della specifica matrice biologica (plasma, urine, o altre matrici) devono essere ottenute da almeno sei fonti. Ogni campione in bianco deve essere testato per le interferenze, e la selettività dovrebbe essere assicurata al limite inferiore di quantificazione (LLOQ o *lower limit of quantification*).

Tali potenziali interferenze in una matrice biologica includono componenti endogene della matrice, come metaboliti, prodotti di degradazione, e nello studio attuale, trattamenti concomitanti e altri xenobiotici esogeni¹⁸. Se il metodo è destinato a quantificare più di un analita, ciascun analita deve essere testato per assicurare che non vi sia interferenza.

B. Accuratezza, precisione, e recupero

L'accuratezza di un metodo analitico descrive la vicinanza dei risultati ottenuti in media nel test al vero valore di concentrazione dell'analita. L'accuratezza è determinata replicando analisi di campioni contenenti quantità note dell'analita. La precisione deve essere misurata utilizzando un minimo di cinque determinazioni per concentrazione. Si raccomanda un minimo di tre concentrazioni per la gamma di concentrazioni previste. Il valore medio dovrebbe essere entro il 15% dal valore reale se non a LLOQ, dove non deve deviare di oltre il 20%.

La deviazione della media dal valore vero serve come misura di precisione. La precisione di un metodo analitico descrive la vicinanza delle singole misure di un analita quando la procedura viene applicata più volte per aliquote multiple di un unico omogeneo volume di matrice biologica. La precisione deve essere misurata con un minimo di cinque determinazioni per concentrazione. Perciò si raccomanda un minimo di tre concentrazioni nell'intervallo previsto di concentrazioni. La precisione determinata a ogni livello di concentrazione non deve superare il 15% del coefficiente di variazione (CV) ad eccezione del LLOQ, dove non dovrebbe superare il 20% del CV (% *Coefficiente di variazione percentuale*)¹⁹.

¹⁸ Xenobiotici: sostanze estranee alla normale nutrizione dell'organismo e al suo normale metabolismo; può indicare sia sostanze naturali (e in tal caso la nozione di xenobiotico è legata al tipo di organismo; per es., la nicotina è uno xenobiotico per l'uomo, ma non per la pianta di tabacco), sia tutte le sostanze biologicamente attive sintetizzate ex novo in laboratorio (per es., gli insetticidi clorurati, i solfamidici, l'eroina, la saccarina).

Vedi <http://www.treccani.it/vocabolario/xenobiotico/>.

¹⁹ Vedi a proposito pag.15: F. Raccomandazioni specifiche per la convalida del metodo.

La precisione richiede ulteriore suddivisione in ripetibilità *intra-run*, *intra-batch* (entro la stessa corsa, entro un lotto o partita), che valuta la precisione durante una singola esecuzione di analisi, e fra i vari percorsi, in ripetibilità *interbatch* che indica la precisione o riproducibilità tra i vari lotti di campioni, e misura la precisione entro il tempo; essa può coinvolgere diversi analisti, apparecchiature, reagenti, e laboratori.

Il recupero di un analita in un saggio è invece la risposta del rivelatore ottenuto da una quantità di analita aggiunto ed estratto dalla matrice biologica, rispetto alla risposta del rivelatore ottenuto per concentrazione effettiva del puro autentico standard. Al recupero si riferisce l'efficienza di estrazione in un metodo analitico entro i limiti di variabilità. Il recupero dell' analita non deve essere al 100%, ma il grado di recupero di un analita e dello standard interno dovrebbe essere coerente, preciso e riproducibile. Esperimenti di recupero devono essere eseguiti confrontando i risultati analitici per campioni estratti a tre concentrazioni (bassa, media, e alta) con gli standard non estratti che rappresentano il recupero al 100%.

C. Calibrazione / Curva Standard

Una curva standard di calibrazione è la relazione tra la risposta dello strumento e una concentrazione nota dell'analita. Una curva di calibrazione deve essere generata per ogni analita nel campione. Un numero sufficiente di standard dovrebbe essere utilizzato per definire adeguatamente il rapporto tra concentrazione e risposta. Occorre una curva di calibrazione preparata nella stessa matrice biologica dei campioni per studiare gli arricchimenti della matrice con concentrazioni note dell'analita. Il numero di standard utilizzato per costruire una curva di calibrazione sarà una funzione della gamma prevista di valori analitici e la natura del rapporto analita / risposta rilevata.

Le Concentrazioni di standard dovrebbero essere scelte sulla base del *range* di concentrazione previsto in un particolare studio. Una curva di calibrazione deve essere costituita da un campione in bianco (campione della matrice elaborato senza standard interno), un campione zero (campione della matrice trattato stavolta con standard interno), e 6-8 campioni non-zero; essi coprono l'attesa gamma, tra cui il LLOQ.

C. 1. Limite inferiore di quantificazione (LLOQ)

Lo standard più basso sulla curva di calibrazione deve essere accettato come il limite di quantificazione se le seguenti condizioni sono soddisfatte:

La risposta C (il picco) dell'analita al LLOQ dovrebbe essere almeno 5 volte maggiore rispetto alla

risposta in bianco. Il picco dell'analita C (risposta) deve essere identificabile, discreto, e riproducibile con una precisione del 20% e accuratezza del 80-120%.

C. 2. Curva di calibrazione / Curva Standard / concentrazione-risposta

Dovrà essere usato il modello più semplice che descrive adeguatamente il rapporto concentrazione-risposta. Dovrebbe essere giustificata la selezione di peso e l'uso di una equazione complessa di regressione. Le seguenti condizioni devono essere soddisfatte per lo sviluppo di una curva di calibrazione: deviazione fino al 20% della concentrazione nominale C, dal LLOQ. Deviazione degli standard dal LLOQ fino al 15% rispetto alla concentrazione nominale C.

Almeno quattro dei sei standard diversi da zero devono soddisfare i criteri di cui sopra, tra cui il LLOQ e lo standard di calibrazione alla concentrazione massima. Escludendo gli standard, i criteri non dovrebbero modificare il modello utilizzato.

D. Stabilità

La stabilità del farmaco in un fluido biologico è funzione delle condizioni di stoccaggio, delle proprietà chimiche del farmaco, della matrice, e del sistema contenitore. La stabilità di un analita in un particolare sistema di matrici e contenitore è rilevante solo in quel sistema matrice-contenitore e non deve essere estrapolata per altre matrici e sistemi di contenimento. Procedure di stabilità dovrebbe valutare la stabilità degli analiti durante il prelievo e la manipolazione, e dopo lungo periodo (congelato a temperatura di conservazione prevista) e a breve termine (da banco [*bench top*], a temperatura ambiente) dall'inizio della conservazione, e infine dopo passaggi attraverso cicli di gelo e disgelo o dopo un processo analitico. Utilizzati in condizioni di stabilità gli esperimenti dovrebbero riflettere situazioni che si possono verificare durante la manipolazione del campione effettivo e relativa analisi. La procedura dovrebbe inoltre includere una valutazione della stabilità dell'analita in soluzione madre.

Tutte le determinazioni di stabilità dovrebbe utilizzare una serie di campioni preparati da una soluzione dell'analita stoccata di fresco(nel caso *analita-free*), senza interferenze della matrice biologica. Le soluzioni dello stock dell'analita per la valutazione della stabilità devono essere preparate in un solvente appropriato a concentrazioni note.

D. 1. Stabilità di Congelamento e scongelamento

La Stabilità dell'analita deve essere determinata dopo tre cicli di gelo e disgelo. Almeno tre aliquote a concentrazioni basse e alte devono essere conservate al previsto grado di temperatura di conservazione per 24 ore e scongelati a temperatura ambiente senza assistenza. Quando completamente scongelati, i campioni devono essere ricongelati per 12 a 24 ore alle stesse condizioni. Il ciclo di congelamento-scongelamento deve essere ripetuto altre due volte, quindi analizzati nel terzo ciclo. Se un analita è instabile alla temperatura di conservazione previsto, il campione di stabilità dovrebbe essere congelato a -70 ° C nel corso dei tre cicli di gelo e disgelo.

D. 2. Per brevi periodi di stabilità

Tre aliquote di ciascuna delle concentrazioni basse e alte vanno scongelate a temperatura ambiente e mantenute a questa temperatura da 4 a 24 ore (in base alla prevista durata del campione che sarà mantenuto a temperatura ambiente nello studio previsto) e analizzate.

D. 3. Stabilità a lungo termine

Il tempo di conservazione in una valutazione della stabilità a lungo termine deve superare il tempo tra la data di raccolta del primo campione e la data di analisi dell'ultimo campione. Affinché la stabilità a lungo termine possa essere determinata bisogna memorizzare almeno tre aliquote di ciascuna delle 2, la bassa e la alta concentrazione, alle stesse condizioni dei campioni di studio. Il volume dei campioni dovrebbe essere sufficiente per l'analisi in tre diverse occasioni. Le concentrazioni di tutti i campioni di stabilità devono essere confrontate con la media dei valori già calcolati per lo standard nelle concentrazioni appropriate dal primo giorno del test di stabilità a lungo termine.

D. 4. Stabilità della Soluzione madre

La stabilità delle soluzioni madre di droga e lo standard interno devono essere valutati a temperatura ambiente per almeno 6 ore. Se le soluzioni madre sono refrigerate o congelate per il periodo interessato, la stabilità deve essere documentata. Dopo il completamento del tempo di conservazione desiderato, la stabilità deve essere verificata confrontando la risposta dello strumento con quella di soluzioni preparate di fresco.

D. 5. Stabilità post- preparazione

Per la stabilità dei campioni trasformati, anche il tempo trascorso nel campionatore automatico,

dovrebbe essere determinato. La stabilità del farmaco e lo standard interno deve essere valutata nel tempo di esecuzione previsto per la dimensione del lotto per campioni di validazione, determinando concentrazioni sulla base di standard di calibrazione originali.

Anche se l'approccio tradizionale di confronto dei risultati analitici per i campioni conservati con quelli per i campioni preparati al momento è stato definito in questa guida, si possono utilizzare altre fonti statistiche con approcci basati sulla fiducia dei limiti per la **valutazione della stabilità di un analita** = **s** in un matrice biologica. La procedura operativa standard (il cosiddetto POS) deve descrivere chiaramente il metodo statistico e le regole utilizzate. Validazioni aggiuntive possono comprendere studi su campioni soggetti a dosaggio.

E. Principi di validazione del metodo bio- analitico e sua istituzione

- I parametri fondamentali per garantire l'accettabilità della esecuzione di una validazione del metodo bioanalitico sono dunque l'accuratezza, la precisione, la selettività, la sensibilità, la riproducibilità e la stabilità.
 - Si deve mettere per iscritto una specifica descrizione dettagliata del metodo bio analitico. Questo può essere nella forma di un protocollo, programma di studio, relazione, e / o SOP.
 - Ogni passo del metodo deve essere esaminato per determinare la misura in cui una variabile ambientale, della matrice, del materiale, o variabili procedurali possono influenzare la stima di un analita nella matrice stessa dal momento della raccolta del materiale fino al momento della analisi.
 - Può essere importante considerare la variabilità della matrice a causa della natura fisiologica del campione. Nel caso di procedure basate su LC-MS-MS è necessario adottare opportune precauzioni per garantire l'assenza di effetti-matrice durante l'applicazione del metodo, soprattutto se la natura delle modifiche dipende dalla matrice utilizzata durante la validazione del metodo.
 - Un metodo bioanalitico dovrebbe essere convalidato per l'uso previsto o l'applicazione.
- Tutti gli esperimenti utilizzati per fare affermazioni o trarre conclusioni circa la validità del metodo devono essere presentati in un rapporto (report di convalida del metodo).
- Quando possibile, la stessa matrice biologica come la matrice prevista in campioni deve essere utilizzata per scopi di validazione. (Per i tessuti di disponibilità limitata, come il midollo osseo, può essere sostituito da matrici di un omologo fisiologicamente adeguate.)
 - La stabilità dell'analita (farmaco e / o metabolita) nella matrice durante il processo di raccolta e il periodo di conservazione del campione deve essere valutata, preferibilmente prima dell'analisi del campione.
 - Per composti aventi metaboliti potenzialmente labili, dovrebbe essere confermata la stabilità dell'analita nella matrice di soggetti trattati (o specie).

- L'accuratezza, precisione, riproducibilità, funzione di risposta, e la selettività del metodo di sostanze endogene, metaboliti e prodotti di degradazione noti devono essere stabiliti per la matrice biologica. Per la selettività, ci dovrebbe essere la prova che la sostanza quantificata è l'analita previsto.
- L'intervallo di concentrazioni nel quale l'analita verrà determinato deve essere definito nella metodica bioanalitica, sulla base di una valutazione degli effettivi campioni standard per tutta la gamma, compresa la loro variazione statistica. Questo definisce la curva standard.
- Un numero sufficiente di standard dovrebbe essere utilizzata per definire adeguatamente il rapporto tra concentrazione e risposta. Si deve dimostrare che la relazione tra risposta e concentrazione è continua e riproducibile. Il numero di standard utilizzati dovrebbe essere una funzione della gamma dinamica e la natura del rapporto concentrazione-risposta. In molti casi, 6-8 concentrazioni (esclusi i valori del bianco) possono definire la curva standard. Un numero più alto di concentrazioni standard può essere raccomandato per disallineare più che per rapporti lineari.
- La possibilità di diluire i campioni originariamente sopra il limite superiore della curva standard deve essere dimostrato da accuratezza e precisione nei parametri della validazione.
- In considerazione di analisi ad alto rendimento, incluse ma non limitate a multiplazione [la **multiplazione**, (o **multiplexing**), è il meccanismo o tecnica per cui più canali trasmissivi in ingresso condividono la stessa capacità di trasmissione disponibile in uscita], a multicolonna, e a sistemi paralleli, dovrebbero essere utilizzati campioni QC (**Quality control sample**) sufficienti per garantire il controllo del dosaggio. Il numero di campioni di QC per garantire un adeguato controllo del dosaggio deve essere determinato in base alla dimensione “percorso”. Il collocamento dei campioni QC dovrebbe essere giudiziosamente considerato in ciascun esperimento.
- In un metodo bioanalitico che sia da considerare valido, i criteri di accettazione dovrebbero essere previsti appositamente in anticipo, dopo averli ottenuti con accuratezza e precisione per la validazione dei campioni di QC oltre la gamma degli standard.

F. Raccomandazioni specifiche per la validazione del metodo

- La curva standard basata sulla matrice dovrebbe essere costituita su un minimo di sei punti standard, esclusi i campioni bianchi, utilizzando campioni singoli o da replicare. La curva standard deve coprire la intera gamma di concentrazioni previste.
- L'adattamento della curva standard è determinato applicando il modello più semplice che sia in grado di descrivere adeguatamente la concentrazione-risposta attraverso un ponderato, appropriato

test statistico per la bontà di adattamento.

- LLOQ è la più bassa concentrazione della curva standard che può essere misurata con una precisione sufficiente. Il LLOQ dovrebbe essere stabilito con almeno cinque campioni indipendenti di standard e si dovrebbe determinare il coefficiente di variazione e / o l'intervallo di confidenza del caso. Il LLOQ dovrebbe servire come la più bassa concentrazione della curva standard e non deve essere confuso con il limite di rilevazione e / o il QC del campione basso. Il più alto standard definirà il limite superiore di quantificazione (ULOQ) di un metodo analitico.

- Per la validazione del metodo bioanalitico, si deve considerare con accuratezza e precisione un minimo di cinque determinazioni per livello di concentrazione (esclusi i campioni bianchi).

Il valore medio dovrebbe essere entro $\pm 15\%$ del valore teorico, se non al LLOQ, dove non deve superare $\pm 20\%$. La precisione attorno al valore medio non deve superare il 15% del CV (**Coefficiente di variazione percentuale**), tranne il LLOQ, dove non deve deviare oltre il 20% del CV.²⁰

Altri metodi di valutazione dell'accuratezza e precisione che rispondono a questi limiti possono essere altrettanto accettabili.

- L'accuratezza e la precisione con cui concentrazioni note di analita in matrice biologica possono essere determinati deve però essere dimostrata. Questo può essere ottenuto mediante analisi da replicare in una serie di campioni di analiti di nota C concentrazione in campioni QC da un equivalente matrice biologica. Come minimo, devono essere studiate tre concentrazioni che rappresentano l'intero *range* della curva standard: uno all'interno del limite inferiore di quantificazione (LLOQ) moltiplicato x 3 (campione QC basso), uno vicino al centro (QC intermedio), e uno vicino alla parte superiore al contorno della curva standard (QC alto).
- riportati i dati di validazione del metodo e la determinazione di accuratezza e precisione devono essere segnalati tutti i valori anomali; tuttavia, i calcoli di accuratezza e precisione escludono valori che sono statisticamente determinati come valori anomali.
- Si dovrebbe dapprima accertare la stabilità dell'analita in matrice biologica destinata alle temperature di stoccaggio. Si deve poi studiare l'influenza dei cicli gelo-disgelo (da un minimo di tre cicli a due concentrazioni, ma reiterate tre volte).
- La stabilità dell'analita in matrice a temperatura ambiente deve essere valutata per un tempo pari al periodo di preparazione del campione tipico, manipolazione del campione, tempi di esecuzione e di analisi.
- La eventuale riproducibilità di una re-iniezione dovrebbe essere valutata per determinare se una

²⁰Vedi <http://www.iss.it/binary/publ/cont/Rapp.%20Istisan%2099-24.1182323337.pdf>: S. Pichini, A. Palmeri, M. Pellegrini, P. Zuccaro e R. Pacifici, *Proposta di linee guida per l'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nei capelli*, Rapporti Istisan, 99/24, 3.1.4, p. 20: E' il coefficiente di variazione percentuale (%CV) o deviazione standard relativa (RSD=relative standard deviation).

seduta analitica possa essere ripetuta in caso di guasto dello strumento.

- La specificità della metodologia di test dovrebbe essere stabilita con un minimo di sei fonti indipendenti dalla matrice stessa. Per i metodi di *ifenazione*²¹, basati sulla spettrometria di massa tuttavia, testando sei matrici indipendenti, ciò potrebbe risultare non importante per l'interferenza. Nel caso di procedure basate su LC-MS e LC-MS-MS, gli effetti sulla matrice devono essere studiati per garantire che la precisione, la selettività e la sensibilità non sia compromessa.

Metodi di selettività devono essere valutati durante lo sviluppo di tutto il processo di validazione e può continuare durante l'applicazione del metodo per campioni di studio reali.

- Criteri di spicco per l' Accettazione / rifiuto, di standard di calibrazione a base di matrice, e la validazione dei Campioni QC dovrebbero essere basati sulla concentrazione nominale (teorica) degli analiti.

Un Criterio specifico può essere impostato in anticipo e ottenuto per accuratezza e precisione nella gamma degli standard, se lo si desidera.

V. LO SVILUPPO DEL METODO: Test Microbiologici e Test con legame per ligandi

Molti dei parametri di validazione bioanalitici e principi discussi sopra sono applicabili anche alle analisi microbiologiche e al tipo di legame con un ligando. Tuttavia, questi campioni possiedono alcune caratteristiche uniche che dovrebbero essere considerate durante la validazione del metodo.

A. Problemi di selettività

Come con metodi cromatografici, i test microbiologici e lo studio del legame con ligandi, devono essere selettivi per l'analita. Le seguenti raccomandazioni per il trattamento con due aspetti di selettività dovrebbero essere presi in considerazione:

1. Interferenza da sostanze simili all' analita dal punto di vista fisico-chimico

- Reattività crociata dei metaboliti, farmaci concomitanti, o composti endogeni dovrebbero essere valutati singolarmente e in combinazione con l'analita di interesse.
- Quando possibile, il saggio immunologico deve essere confrontato con il metodo validato di riferimento (ad esempio LC-MS) utilizzando campioni reali e criteri predeterminati per ammettere la precisione del metodo immunologico di riferimento.

²¹ Ifenazione, dall'ingl. *Hyphenated* significa lett. "sillabato", ovvero, legato da un trattino, come nel caso LC-MS-MS.

- La linearità della diluizione rispetto allo standard di riferimento dovrebbe essere valutata nel corso di studio di appositi campioni .
- La selettività può essere migliorata per alcuni analiti incorporando stadi di separazione prima di un test di immunodosaggio.

2. Gli effetti di matrice non collegati all'analita

- La curva standard nei liquidi biologici devono essere comparata con lo standard nel tampone per eliminare gli effetti della matrice.
- Deve essere valutato il confronto tra campioni diluiti in studio e gli standard diluiti, nel rilevare gli effetti della matrice.
- Si deve determinare anche un eventuale legame non specifico.

B. Problemi di quantificazione

Le Curve standard su test microbiologici e immunologici sono intrinsecamente non lineari e, in generale, più punti di concentrazione possono essere addirittura raccomandati per definirne la forma sopra la gamma di curva standard per i test chimici. Oltre alle loro caratteristiche non lineari, la risposta di errore in rapporto di curve di immuno-dosaggio standard, è una funzione non costante della risposta media (*heteroscedasticity* da cause esterne)²².

Per questi motivi, si raccomanda un minimo di sei concentrazioni diverse da zero del calibratore, eseguiti in duplicato. Il rapporto concentrazione-risposta è spesso ricavato su un modello con 4 - o 5 parametri logistici, anche se altri possono essere utilizzati per la convalida.

L'uso di punti di ancoraggio alle estremità asintotiche (*asintotico* si dice di un valore che tende ad approssimarsi il più possibile a un altro, senza mai coincidere con esso) alla concentrazione alta e bassa della curva standard, potrebbe migliorare la forma generale della curva. Generalmente, questi punti di ancoraggio si trovano alle concentrazioni al di sotto della LLOQ stabilito e al di sopra della ULOQ stabilito.

Quando possibile, i calibratori devono essere preparati nella matrice dei campioni in studio o in una matrice alternativa di caratteristiche equivalenti. Sia il limite superiore (*Upper limit of quantification* o ULOQ) che l'inferiore, (cioè il *Lower limit of quantification* o LLOQ) dovrebbero essere definiti con accuratezza accettabile, precisione, o criteri di intervallo di confidenza sulla base dei requisiti di

²² In statistica, l'omoschedasticità (dal greco, *stessa varianza*) è una condizione ideale nella quale si trova una funzione di dati rappresentabili graficamente come dispersi in maniera abbastanza omogenea al di sopra od al di sotto di una linea retta. Il termine deriva direttamente da *homoscedasticity* usato come sinonimo di omogeneità delle varianze e *heteroscedasticity* sinonimo di eterogeneità delle varianze, introdotte da Karl Pearson nel 1905. Cfr. <http://it.wikipedia.org/wiki/Omoschedasticit%C3%A0>.

studio.

Per tutti i test il fattore chiave è la precisione dei risultati riportati. Questa precisione può essere migliorata con l'uso di campioni replicati. Nel caso in cui campioni replicati dovessero essere esplorati durante la validazione per migliorare la precisione, la stessa procedura deve essere seguita come per i campioni sconosciuti.

Le seguenti raccomandazioni si applicano alle questioni di quantificazione:

- Se la separazione viene usata prima del dosaggio per i campioni di studio, ma non per gli standard, è importante stabilire il recupero e utilizzarlo per determinare i risultati. Possibili approcci per valutare l'efficienza e la riproducibilità di recupero sono (1) l'uso di analita tracciante radioattivo (quantità troppo piccola per influenzare il test), (2) la precisione di un recupero riproducibile, (3) l'utilizzo di uno standard interno non riconosciuto dagli anticorpi può essere confrontato con un'altra tecnica.
- reagenti chiave, come gli anticorpi, tracciante, standard di riferimento, e la matrice devono essere caratterizzati in modo appropriato e conservati in condizioni definite.
- Le valutazioni di stabilità dell'analita devono essere condotte con uno studio dalla vera matrice (ad esempio, non si dovrebbe utilizzare una matrice già spogliata per rimozione di interferenze endogene).
- I criteri di accettazione: Almeno il 67% (4 su 6) dei campioni di QC deve essere entro il 15% del rispettivo valore nominale, il 33% dei campioni di QC (non tutti i replicati alla stessa concentrazione) può essere al di fuori del 15% del valore nominale. In certe situazioni, possono essere giustificati più ampi criteri di accettazione.
- La ri-ottimizzazione o la validazione del test possono essere importanti quando ci sono cambiamenti in reagenti-chiave, come segue:

Analita marcato (tracciante)

- Allora, il nuovo legame deve essere ri-ottimizzato.
- l'esecuzione dovrebbe essere verificate con curva standard e QC (**Quality control sample**).

Anticorpo

- la reattività crociata-chiave deve essere controllata.
- L'esperimento con l'analita tracciante (*Tracer*) di cui sopra deve essere ripetuto.

Matrice

L'esperimento con l'analita tracciante (*Tracer*) di cui sopra deve essere ripetuto.

- Gli esperimenti di sviluppo del metodo devono includere un minimo di sei passaggi effettuati per diversi giorni, con almeno quattro concentrazioni (LLOQ, bassa, media e alta) duplicando l'analisi in ogni seduta.

VI. APPLICAZIONE DEL METODO DI VALIDAZIONE per analisi di routine su droghe

I saggi di tutti i campioni di un analita in una matrice biologica dovrebbero essere completati entro il periodo di tempo per cui i dati di stabilità sono disponibili. In generale, i campioni biologici possono essere analizzati con una singola determinazione senza doppia analisi o replicazione se il metodo di dosaggio presenta variabilità accettabile come definito dai dati di validazione. Questo è vero per le procedure la cui variabilità di precisione e accuratezza rientrano di routine nei limiti accettabili di tolleranza. Per una procedura difficile con un analita labile dove l'alta precisione e la specificazione di accuratezza possono essere difficili da raggiungere, si possono eseguire duplicazioni o addirittura triplicazioni dell'analisi per una stima migliore dell'analita.

Una curva di calibrazione deve essere generata per ciascun analita per campioni in esame in ogni seduta analitica e deve essere usata per calcolare la concentrazione dell'analita nei campioni sconosciuti durante il percorso.

I campioni arricchiti possono contenere più di un analita. Una seduta analitica può comprendere campioni di QC (**Quality control sample**), standard di calibrazione, e sia (1) tutti i campioni preparati da analizzare come una partita, o (2) un lotto composto da elaborazione di campioni sconosciuti di uno o più volontari in uno studio. La curva di calibrazione dello standard deve coprire l'atteso intervallo di concentrazione del campione sconosciuto, in aggiunta ad un campione calibratore al LLOQ (*Lower limit of quantification*). Una stima della concentrazione nei campioni sconosciuti per estrapolazione di curve standard al di sotto di LLOQ, o sopra i più alti standard non è raccomandato. Al contrario, la curva standard deve essere ridefinita oppure devono essere diluiti e quindi analizzati nuovamente campioni con una maggiore concentrazione. E' preferibile analizzare tutti i campioni di studio prelevati da un soggetto in un'unica seduta.

Una volta che il metodo analitico è stato validato per l'uso di routine, l'accuratezza e la precisione dovrebbe essere controllati periodicamente per assicurare che il metodo continui a funzionare in modo soddisfacente. Per raggiungere questo obiettivo, una serie di campioni di QC preparati separatamente devono essere analizzati con campioni usati per il test.

I campioni, sono prelevati ad intervalli in base al numero totale di campioni. I campioni di QC in duplicato a tre concentrazioni (uno vicino al LLOQ -vale a dire, 3 x LLOQ-, uno in gamma media, e

uno vicino alla fascia alta della gamma) dovrebbero essere incorporati in ciascun campione del percorso analitico. Il numero di campioni QC (multipli di tre) dipende dal numero totale di campioni nel percorso. I risultati dei campioni di QC costituiscono la base per accettare o rifiutare l'intero procedimento.

Almeno quattro su sei campioni QC dovrebbe essere entro il 15% del rispettivo valore nominale. Due dei sei campioni QC possono anche essere al di fuori del 15% del rispettivo valore nominale, ma non entrambi alla stessa concentrazione.

Occorre rilevare le seguenti raccomandazioni nell'applicazione di un metodo bioanalitico al farmaco durante l'analisi di routine:

- Una curva standard a base di matrice dovrebbe essere determinata da un minimo di sei punti standard, escluse le schede bianche (singole o replica), che coprono l'intera gamma.
- Per la *Funzione di risposta*: in genere, bisognerebbe usare, lo stesso disegno della curva, la ponderazione, e la bontà di adattamento già determinati durante la validazione dello studio preventivo. La Funzione di risposta è determinata da appropriati test statistici basati su effettivi punti standard durante ogni ciclo nella validazione. Eventuali cambiamenti della funzione di risposta nel rapporto tra la validazione preventiva e validazione di routine durante l'esecuzione, indica già dei potenziali problemi.
- I campioni QC devono essere utilizzati per accettare o rifiutare il procedimento. Questi campioni di QC sono matrice addizionata di analita.
- adeguatezza del sistema: Sulla base della analita e la tecnica, una specifica SOP (o campione) dovrebbe essere identificato per garantire il funzionamento ottimale del sistema utilizzato.
- Le diluizioni dei campioni richiesti dovrebbero essere simili alla matrice (per esempio, da uomo a uomo) ovviando alla necessità di integrare l'effettiva diluizione dei campioni di QC matrice se lo studio è già avviato.
- Ripetere le analisi: E' importante stabilire un SOP (procedura operativa standard) o alcune linee guida per l'analisi e la ripetizione dei criteri di accettazione. Questa SOP o linea guida dovrebbe spiegare i motivi della ripetizione dell'analisi del campione.

Le ragioni per ripetere le analisi potrebbero includere l'analisi di ripetizione di clinica o preclinica, campioni per fini regolamentari, incoerente ripetizione di analisi, i campioni al di fuori della gamma dei test, errori di elaborazione del campione, guasti alle apparecchiature, cromatografia *povera* su carta da filtro²³ O infine, i test vanno ripetuti in caso di inconsistenti dati di farmacocinetica.

²³ Cfr. <http://www.minerva.unito.it/Storia/ChimicaClassica/Cromatografia/CROM4.htm>. : A New York infatti, nel 1979, A.H. Gordon ricordando innanzi tutto come la cromatografia di ripartizione su colonna non desse risultati

Il riesame deve essere eseguito in triplo se il volume del campione lo permette. Il razionale per l'analisi e la segnalazione di ripetizione dell'analisi devono essere chiaramente documentati.

- Reinserimento dei dati del campione: si dovrà stabilire un SOP o linea guida per il reinserimento di dati del campione. Questa SOP o linea guida dovrebbe spiegare le ragioni di reinserimento e di come esso debba essere eseguito. Il razionale per la reintegrazione deve essere chiaramente descritto e documentato. I dati originali e la reintegrazione devono essere segnalati.

Criteri di accettazione per la “corsa”(seduta di analisi)

I criteri di accettazione di seguito deve essere considerati per accettare la seduta analitica:

- Standard e campioni di controllo possono essere preparati dallo stesso picco della soluzione madre, purché la stabilità della soluzione e la precisione siano state verificate. Si può anche utilizzare una singola fonte della matrice purché la selettività sia stata verificata.
- I campioni della curva standard, quelli in bianco, il campione per il QC (**Quality control sample**) e i campioni di studio possono essere organizzati come considerato appropriatamente all'interno della serie.
- Posizionamento di standard e campioni di controllo QC all'interno di un ciclo devono essere messi in conto per poter rilevare un test “alla deriva”, cioè a lungo termine.
- I campioni di calibrazione dello standard a base di Matrice: o al 75%, o un minimo di sei standard, sono accettabili quando il retro-calcolo (comprese ULOQ [*Upper limit of quantification*]) rientri in $\pm 15\%$, fatta eccezione per il LLOQ, in cui dovrebbe essere entro $\pm 20\%$ del valore nominale. I Valori che non rientrano in questi limiti possono essere scartati, a condizione di non modificare il modello stabilito.
- I Criteri di accettazione per accuratezza e precisione -come indicato nella sezione IV F, "*Raccomandazioni specifiche per la validazione del metodo*"- dovrebbero essere programmati sia giornalmente che a termine di un esperimento.”
- Il Controllo di Qualità: In ogni esecuzione i **Controlli di Qualità** andrebbero replicati (almeno una volta) ad un minimo di tre concentrazioni (una all'interno della LLOQ 3x (QC bassa), una in gamma media (al centro QC), e una si avvicinerà alla fascia alta della gamma (QC alto). I risultati dei campioni di QC costituiscono la base di accettare o di rifiuto dell'iter analitico.

Almeno il 67% (quattro su sei) dei campioni di QC dovrebbe essere entro il 15% della loro rispettivo valore nominale (teorico); il 33% dei valori dei campioni di QC (non tutte le repliche allo stesso

abbastanza sensibili nel caso degli amminoacidi acetilati, faceva cadere una goccia di eluito su carta da filtro, la faceva essiccare, la impregnava con soluzione di ninidrina e faceva essiccare ancora a 100°. Disse Gordon: "Martin fece l'essenziale salto (*jump*) intellettuale e suggerì che la carta da filtro di per sé poteva essere una matrice cromatografica adatta".

concentrazione) può essere al di fuori $\pm 15\%$ del valore nominale. Un intervallo di confidenza in ogni approccio che ottenga una precisione analoga, può essere una alternativa appropriata.

Il numero minimo di campioni (in multipli di tre) deve essere almeno il 5% del numero di campioni non noti oppure sei QC totali, qualunque ne sia un eventuale maggior numero.

- I campioni che coinvolgono più analiti non dovrebbero essere respinti sulla sola base dei dati di un analita che non avesse i criteri di accettazione.
- I dati precisi dei tentativi scartati non devono essere documentati, ma il fatto che un dato iter (la “corsa”) è stato respinto ed il motivo per il fallimento devono essere registrati.

VII. DOCUMENTAZIONE

La validità di un metodo analitico dovrebbe essere stabilita e verificata da studi di laboratorio, e documentazione di completamento con successo di questi studi dovrebbero essere fornite nel segnalare la validazione di un test. I SOP generali e specifici, cercando di mantenere buoni risultati, sono una parte essenziale di una validazione del metodo analitico. I dati generati per lo stabilimento di una metodica bioanalitica e i QC devono essere documentati e disponibili per la verifica dei dati e di ispezione. La Documentazione da presentare alla Agenzia dovrebbe includere (1) informazioni di riepilogo, (2) lo sviluppo dei metodi e la loro stabilizzazione, (3) le relazioni bioanalitiche dell'applicazione di tutti i metodi di analisi dei campioni di routine, e (4) altre informazioni applicabili agli sviluppi del metodo e alla loro istituzione definitiva e / o per l'analisi del **campione di routine**.

A. Informazioni di riepilogo

Le Informazioni sintetiche dovrebbero includere:

- La Tabella riepilogativa dei report di validazione, tra cui la validazione del metodo analitico, rivalidazione parziale, e i rapporti sulla validazione crociata. La tabella dovrebbe essere in sequenza cronologica, e comprendere un codice di identificazione del metodo di dosaggio, il tipo di campione, e la ragione per la validazione del nuovo metodo o per una validazione aggiuntiva (ad esempio, per ridurre il limite di quantificazione).
- La Tabella riassuntiva dovrebbe essere fornita con l'elenco, cioè secondo protocollo, dei metodi di analisi utilizzati. Il numero di protocollo, il titolo del protocollo, il tipo di campione, il codice di identificazione del metodo di analisi, e il codice del rapporto bio-analitico.
- Dovrebbe essere inoltre disponibile una tabella riassuntiva che consenta riferimenti incrociati dei codici di identificazione (ad esempio, quando un campione ha diversi codici per il metodo di analisi, il

report di validazione, e le relazioni bioanalitiche, soprattutto quando lo sponsor e il laboratorio incaricato con un contratto assegnino due codici diversi).

B. Documentazione per l'Istituzione di un Metodo

La Documentazione per lo sviluppo del metodo e la sua istituzione dovrebbe includere:

- Una descrizione operativa del metodo analitico
- La prova di purezza e identità degli standard di droga, lo standard del metabolita, e standard interni utilizzati negli esperimenti di validazione
- Una descrizione di studi di stabilità e di dati di supporto
- Una descrizione di esperimenti condotti per determinare l'accuratezza, la precisione, il recupero, la selettività, il limite di quantificazione, la curva di calibrazione (le equazioni e le funzioni di ponderazione utilizzati, se presenti), e dei dati pertinenti, ottenute da questi studi.
- Documentazione di precisione e accuratezza nel test e tra i test.
- In comunicazioni NDA, le informazioni di validazione crociata dei dati dello studio, se del caso.
- I cromatogrammi leggibili annotati o gli spettrogrammi di massa, se del caso.
- Eventuali deviazioni dalle POS, protocolli o GLP (se del caso), e le giustificazioni delle deviazioni.

C. Applicazione alle analisi di routine per le droghe

La documentazione della applicazione di metodi convalidati bioanalitici all'analisi del farmaco di routine dovrebbe includere:

- La prova di purezza e identità degli standard della droga, gli standard dei metaboliti, e quelli interni utilizzati durante le analisi di routine
- Tabelle di sintesi contenenti le informazioni sul trattamento e la conservazione del campione. Le tabelle devono includere l'identificazione del campione, la raccolta dati, la conservazione prima della spedizione, informazioni sulle spedizione del lotto, e lo stoccaggio prima dell'analisi. Le informazioni devono comprendere le date, gli orari, le condizioni del campione, e qualsiasi deviazione dai protocolli.
- Un tabella riassuntiva dei percorsi di analisi di campioni clinici o preclinici. Le informazioni dovrebbero includere l'iter di identificazione del campione, la data e l'ora di analisi, il metodo di analisi, gli analisti, l'inizio e il tempo di arresto, la durata, le attrezzature significative e le sostanziali modifiche, ed eventuali problemi o deviazioni dal metodo stabilito.

Le equazioni usate per effettuare il ri-calcolo dei risultati²⁴

- Informazioni di sintesi sui valori durante l'analisi e tra le varie analisi di campioni di QC e dati su accuratezza e precisione da curve di calibrazione e campioni di controllo utilizzati per accettare la seduta analitica. Si incoraggiano QC grafici e analisi di tendenze, oltre a dati grezzi e statistiche riassuntive.
- Le tabelle di dati provenienti da cicli di analisi di campioni clinici o preclinici.

Le tabelle devono includere i test di identificazione della sessione di analisi, l'identificazione dei campioni, dati grezzi e di retro-calcolo dei risultati,

i codici, di integrazione e / o i codici di segnalazione di altri.

- Una serie di cromatogrammi completa ottenuta dal 5 fino al 20% dei soggetti, con standard e sieri di controllo da tali iter analitici. Per studi fondamentali di bioequivalenza per il marketing, devono essere inclusi cromatogrammi dal 20% dei soggetti in serie selezionati. In altri studi, si ritengono sufficienti cromatogrammi dal 5% dei soggetti selezionati in modo casuale per ogni studio.

I soggetti i cui cromatogrammi devono essere presentati devono essere definiti prima dell'analisi di eventuali campioni clinici.

- I motivi per i campioni mancanti
- Documentazione per ripetere le analisi. La documentazione deve comprendere quella iniziale e ripetere i risultati delle analisi, il risultato riportato, l'identificazione della seduta di analisi, la ragione per la ripetizione analisi, il richiedente della ripetizione, e il gestore che autorizza la ri-analisi.

Ripetizione analisi di un campione clinico o preclinico deve essere eseguita solo in una SOP

²⁴ (Es.: Una formula per i calcoli e l'espressione dei risultati: [vedi http://ita.arpalombardia.it/console/files/download/31/AQA70_bentazone.pdf.] (modificato).

Se all'equazione della retta di calibrazione:

$$x = \frac{(y - a) * 0.5}{b} \quad \text{dove}$$

x = concentrazione

y = area

b = *slope* (la pendenza)

a = *intercetta* (gli intervalli di confidenza si determinano al 99% per il coefficiente angolare e l'*intercetta*)

0.5= fattore moltiplicativo

Il CV% ponderato è calcolato sulla media di sei repliche di 3 livelli di concentrazione espressi come area di picco; l'asterisco nella formula rappresenta un numero complesso coniugato di un numero complesso dato. I numeri complessi mostrano la loro utilità nel rappresentare onde elettromagnetiche e correnti elettriche ad andamento temporale sinusoidale. Criteri di accettabilità: In base all'*equazione di Horwitz* per i livelli di concentrazione espressi in µg/l il CV % deve essere < 45%). Essa fornisce una stima del valore dell'incertezza di misura di un'analisi, prescindendo dalla natura dell'analita, della matrice e dal metodo di misura impiegato.: $RSD\% = 2^{[1 - 0.5 \log(C)]}$; dove: *RSD%* è la deviazione standard relativa percentuale; *C* è la concentrazione dell'analita espressa in frazione (es. 1 ppm = 0,000001).

predefinita, ovvero una procedura operativa standard.

- Documentazione per i dati reintegrati (reinserimenti). La documentazione deve comprendere quella iniziale e ripetere i risultati di integrazione, il metodo utilizzato per la reintegrazione, il risultato riportato, l'identificazione della sessione di analisi, il motivo per il reintegrazione, il richiedente della reintegrazione, e la direzione che autorizza detto reinserimento. La Reintegrazione di un campione clinico o preclinico dovrebbe essere anch'essa eseguita solo con una SOP predefinito.
- Le deviazioni dal protocollo di analisi o SOP, con motivi e le giustificazioni per le deviazioni.

D. Altre informazioni

Altre informazioni applicabili sia per lo sviluppo del metodo e la creazione e / o alla analisi di routine del campione potrebbero comprendere:

- Elenchi di abbreviazioni e gli eventuali codici supplementari utilizzati, compresi i codici di condizione del campione, codici di integrazione, e codici di segnalazione
- I riferimenti e le copie leggibili di tutti i riferimenti
- SOP o protocolli che coprono le seguenti aree:
- criteri di accettazione Standard di calibrazione o di rifiuto
- criteri di accettazione o il rifiuto della curva di calibrazione
- campione di controllo qualità e i criteri di accettazione o di rifiuto della sessione di analisi.
- I criteri di accettazione per i valori riportati quando tutti i campioni incogniti vengono dosati in duplicazione
- denominazioni del codice del campione, compresi i codici di campioni clinici o preclinici e il codice del campione bioanalitico.
- Assegnazione di campioni clinici o preclinici alle partite del lotto di analisi.
- la raccolta dei campioni, l'elaborazione e la memorizzazione
- Ripetizione di analisi di campioni
- Il reinserimento dei campioni

