Determinazione di sostanze farmacologicamente attive lecite e illecite nel latte materno mediante cromatografia liquida - spettrometria di massa tandem

Emilia Marchei[1], Manuela Pellegrini[1], Maria Concetta Rotolo[1], Ilaria Palmi[1], Oscar Garcia-Algar[2], Diana Escuder[3], Carmen Rosa Pallas[3], Simona Pichini[1], Roberta Pacifici[1]

[1]Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanitá, Roma

[2]Unitat de Recerca Infància i Entorn (URIE), Paediatric Service, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spagna

[3]Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spagna

Questo lavoro è stato in parte presentato al 42° Congresso Nazionale SIBioC, 5-8 ottobre 2010, Roma, sotto forma di poster (Biochim Clin 2010;34:461), ricevendo, nella persona del suo primo autore (E. Marchei), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.

ABSTRACT

Liquid chromatography-mass tandem spectrometry assay (LC-MS/MS) for licit and illicit drugs in breast milk. Breastfeeding is an essential physiologic process that provides nutrition and protects child against infection and immunologic disorders. When drugs are administered to a nursing mother, a small part of them may appear in her milk and can hypothetically have short- and long-term harmful effects on the infant. A LC-MS/MS method for the quantification of frequently used licit (caffeine, nicotine and cotinine) and illicit pharmacologically active drugs (opiates, cocaine, cannabinoids and amphetamines) in breast milk was developed and fully validated. Chromatography was performed on a reverse-phase column using a gradient of 2 mM ammonium acetate, pH 6.6, and methyl alcohol as mobile phase at a flow rate of 0.35 mL/min. Separated analytes were quantified by electrospray ionization tandem mass spectrometry in positive ion mode using multiple reaction monitoring. Milk samples were kept at -20 °C until analysis and compounds under investigation were extracted from the matrix by Bond Elut Certify cartridges. The concentration range covered was from limit of quantification to 1000 μg/L for all the investigated drugs. Intra- and inter-assay CV was <20%, analytical recovery ranged between 51.6% and 86.5%, matrix effect between 71.1% to 116.6% and process efficiency between 46.8% and 79.0%. Analytes were stable after three freeze-thaw cycles, after 6 months of storage at -20 °C and after the pasteurization process (differences from the initial concentration always <10%). This LC-MS-MS assay was applied to screen samples from a Spanish milk bank and samples coming from drug-addicted mothers. The developed method provided adequate sensitivity and performance characteristics to demonstrate the presence of caffeine only in 17.6% of samples from milk donating nursing mothers and the presence of most commonly used illicit drugs and metabolites in breast milk from addicted lactating mothers.

INTRODUZIONE

Il latte umano fornisce al neonato nutrimento, enzimi digestivi, fattori immunologici di vario tipo, fattori di crescita, ormoni e altri fattori bioattivi (1). E' ampiamente accertato che i neonati allattati al seno hanno un rischio minore di sviluppare enterocolite necrotizzante, enterite, otite media, sindrome della morte improvvisa del neonato, infezioni delle vie respiratorie, infezioni da virus, diabete mellito di tipo 1 e allergie (2-4). Per proteggere i neonati allattati al seno da effetti indesiderati derivati dal consumo materno di sostanze farmacologicamente attive sia lecite che illecite, ma anche per permettere un eventuale trattamento farmacologico laddove necessario alle madri che allattano, è essenziale poter ottenere tutte le informazioni sull'escrezione nel latte del farmaco o della droga parente e/o dei suoi metaboliti (5-7). Questo riveste ancor maggiore importanza quando l'allattamento avviene con latte proveniente da banche del latte. Le donne che allattano e che hanno latte in abbondanza possono donare il loro latte ad appositi centri di raccolta, rappresentati appunto dalle banche del latte umano. In Italia 25 centri si sono organizzati per la gestione del latte donato. Questi centri, che nel 2005 hanno fondato l'Associazione Italiana Banche del Latte Umano Donato, sono adibiti alla raccolta e alla conservazione del latte umano e fanno riferimento per la loro attività alle Linee

Corrispondenza a: Emilia Marchei, Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento del Farmaco, Reparto Farmacodipendenza Tossicodipendenza e Doping, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma. Tel. 0649903026, Fax 0649902016, E-mail emilia.marchei@iss.it

Ricevuto: 29.01.2011 Revisionato: 02.03.2011 Accettato: 02.03.2011

Guida redatte dalla Società Italiana di Neonatologia (8). Al momento, nessuno di questi centri svolge esami di natura tossicologica che verifichino la presenza di farmaci o loro metaboliti e di sostanze psicoattive illecite sui campioni di latte donati.

Poiché il latte materno è chiaramente la scelta migliore rispetto al latte in polvere, il latte proveniente dalle banche ha un ruolo ben riconosciuto nella cura dei prematuri e per i neonati affetti da patologie (1). Se una madre in allattamento assume farmaci, una certa percentuale può essere escreta nel latte materno (7). La quantità di farmaco che passa dal plasma al latte materno dipende dalle caratteristiche del farmaco stesso, come il legame alle proteine plasmatiche, la ionizzazione, il grado di lipofilia e il PM. In generale, contribuiscono al passaggio plasma-latte un basso legame alle proteine plasmatiche, un basso PM e un'elevata lipofilia (5). Il passaggio dei farmaci nel latte materno avviene prevalentemente mediante diffusione passiva, ma é possibile anche un passaggio con gradiente attivo (7). Talvolta, poiché esiste una differenza tra il metabolismo neonatale e quello materno, questo passaggio può rilevarsi dannoso (9-11). Per questo motivo, le terapie farmacologiche devono essere limitate e strettamente controllate durante il periodo dell'allattamento. Inoltre, alle madri si raccomanda di interrompere, o almeno di ridurre, l'uso di tabacco, il consumo di caffè e di evitare assolutamente il consumo di droghe d'abuso (5). Purtroppo, nonostante questi avvertimenti, alcune madri continuano a mantenere le loro abitudini per cui non è da escludere la presenza di sostanze lecite o illecite nel latte materno. Di conseguenza, sia nel caso di un sospetto uso di sostanze d'abuso da parte di madri che allattano che, soprattutto, nel caso di latte da donare alle banche, uno screening per l'identificazione di sostanze psicoattive prima dell'allattamento o della donazione potrebbe proteggere il neonato dall'ingestione di composti indesiderati e potenzialmente dannosi.

Il latte materno è una matrice non convenzionale usata per valutare l'esposizione neonatale acuta agli xenobiotici e il suo principale vantaggio è la raccolta semplice e non invasiva. Tuttavia, l'estrazione di farmaci da tale matrice è una delle principali limitazioni metodologiche, a causa della sua alta percentuale proteica, del contenuto lipidico e della composizione che varia durante il periodo postpartum (5). Diversi metodi sono stati pubblicati per la determinazione della nicotina (12-17), della caffeina (17-20), della cannabis (21), della cocaina (22, 23), delle amfetamine (24-26) e del metadone (27-30) nel latte umano. Non ci sono pubblicazioni sul dosaggio di eroina nel latte materno, mentre sono presenti in letteratura due metodi per la ricerca degli oppiacei che riportano la determinazione di codeina e morfina con metodologia radioimmunometrica (31) o mediante cromatografia liquida con rivelatore ad assorbimento U.V. (32). Spesso, solo un numero limitato di sostanze della stessa classe di farmaci sono determinate con queste metodologie.

La cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) è stata proposta da diversi Autori come la procedura d'elezione nel monitoraggio terapeutico dei farmaci in tossicologia clinica e forense, offrendo numerosi vantaggi rispetto alla gas cromatografia associata alla spettrometria di massa (GC-MS), come l'assenza di derivatizzazione e la capacità di quantificare una gamma più ampia di composti, sia lipofili che idrofili, in un unico dosaggio (33, 34). In questo lavoro descriviamo lo sviluppo e la validazione di un metodo LC-MS/MS per la misurazione di sostanze farmacologicamente attive lecite e illecite nel latte materno.

MATERIALI E METODI

Reagenti e soluzioni di lavoro

Morfina (MOR), codeina (COD), 6-monoacetilmorfina (6-MAM), 2-etilene-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP), metadone (MTD), cocaina (COCA), benzoilecgonina (BZE), cocaetilene (CE), nalorfina (NLF), 11-nor-carbossi-Δ9-tetraidrocannabinolo (THC-COOH), 11-idrossi-Δ9-tetraidrocannabinolo (TCH-OH), -Δ9-tetraidrocannabinolo (THC), naftalen-1-il-(1-pentilindolo-3-il)-metanone (JWH-C18), amfetamina (AM), metamfetamina (MA), 3,4-metilenediossimetamfetamina (MDMA), 3,4-metilenediossiamfetamina (MDA), 3,4-metilenediossipropilamfetamina (MDPA) sono stati acquistati da LG Promochem. Nicotina (NIC), cotinina (COT), caffeina (CAF) e N-etilnorcotinina (NENC) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. NLF, JWH-C18, MDPA e NENC sono stati usati come standard interni. Le colonnine per estrazione "Bond Elut Certify" sono state acquistate da Varian. L'acqua e tutti i solventi utilizzati avevano un grado di purezza HPLC.

Le soluzioni madri a concentrazione 1 g/L sono state preparate in alcol metilico. Le soluzioni standard alle concentrazioni di 10, 1 e 0,1 mg/L sono state preparate diluendo le soluzioni madri con alcol metilico e conservate a -20 °C. La soluzione standard degli standard interni risultava pari a 10 mg/L.

Le soluzioni di lavoro e di calibrazione [intervallo di concentrazione: limite di quantificazione (LOQ) - 1000 µg per litro di latte], preparate giornalmente diluendo opportunamente le soluzioni standard in alcol metilico, venivano aggiunte a 0,5 mL di campioni di latte materno precedentemente testati come campioni di controllo.

I campioni utilizzati per il controllo di qualità alle concentrazioni di 850 µg/L (calibratore superiore per tutti gli analiti), 400 µg/L (calibratore medio per tutti gli analiti) e 6 µg/L (calibratore inferiore per MOR, 6-MAM, COD, MA, BZE, COCA, THC, THC-OH, THC-COOH) o 12 µg/L (calibratore inferiore per COT, CAF, NIC, MDA, AM, MDMA, CE, MTD, EDDP) venivano preparati aggiungendo le soluzioni standard a campioni di latte materno precedentemente testati come privi di qualsiasi sostanza farmacologicamente attiva (campioni di controllo). Questi campioni venivano inseriti in ciascuna serie analitica per controllare la linearità, l'imprecisione, l'inesattezza e la stabilità di campioni sottoposti a

conservazione a diverse temperature.

Estrazione degli analiti dalla matrice biologica

A 0,5 mL di campione (controlli, calibratori e campioni di latte) erano aggiunti 0,5 mL di alcol metilico. I campioni sono stati mescolati mediante l'uso di vortex e successivamente centrifugati a 4000 rpm per 5 min. Il sopranatante prelevato è stato diluito con 4 mL ammonio acetato 100 mM pH 5,5 e purificato su colonnine "Bond Elut Certify" precedentemente condizionate con 2 mL di alcol metilico, 2 mL di acqua e 1 mL di ammonio acetato 100 mM pH 5,5. Dopo l'assorbimento del campione, le colonnine sono state lavate con 1 mL di acido cloridrico 0,1 N. L'eluizione degli analiti in esame è stata effettuata con 2 mL di alcol metilico e con 2 mL di una miscela composta da diclorometano:alcol isopropilico (80:20) al 2% di ammonio idrossido. L'eluato, portato a secco sotto flusso d'azoto, è stato ripreso con 0,1 mL di acqua:alcol metilico (20:80, v/v) e 25 µL sono stati iniettati nella colonna cromatografica.

Strumentazione

Per la separazione degli analiti e la loro determinazione è stato utilizzato un sistema cromatografico LC Alliance (Waters) interfacciato con uno spettrometro di massa con triplo quadrupolo Quattro micro (Waters). La separazione cromatografica degli analiti è stata effettuata su colonna Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 x 50 mm, 3,5 µm). La fase mobile utilizzata nella separazione era formata da a) ammonio acetato 2 mM pH 6,6 e b) alcol metilico, con il seguente programma di gradiente: 0,0 min: 10% B; 0,0–11 min: 93% B; 11,1-16,0 min: 93% B; 16,1 min: ritorno alle condizioni iniziali, mantenute fino a 20 min per riequilibrare la colonna. La velocità di flusso era di 0,35 mL/min.

Lo spettrometro di massa operava in modalità positiva e l'acquisizione è stata effettuata monitorando le transizioni ("multiple reaction monitoring") di ciascun analita. I parametri strumentali utilizzati sono stati: voltaggio del capillare 3 kV, temperatura della sorgente 130 °C, temperatura di desolvatazione 500 °C, velocità del gas di desolvatazione e del cono 650 e 30 L/ora, rispettivamente. Il voltaggio del cono, l'energia di collisione e le transizioni scelte sia per la identificazione che per la quantificazione degli analiti sono riportati nella Tabella 1.

Validazione del metodo

I parametri testati per la validazione della metodologia sono stati la linearità, la specificità e selettività, il limite di rilevabilità (LOD), il LOQ, l'imprecisione, l'inesattezza, il "carry-over", l'effetto matrice, il recupero analitico, l'efficienza del processo e la stabilità (35, 36).

La specificità e selettività del metodo, cioè la sua abilità a misurare unicamente ciò che si vuole misurare (uno o più analiti) in presenza di composti affini, sono state testate valutando se esistevano differenze significative tra i dati ottenuti da un'analisi effettuata in presenza e una effettuata in assenza di sostanze note diverse dagli analiti nel campione (metaboliti, prodotti di degradazione, altri xenobiotici). Il LOD, ovvero la più bassa concentrazione di analita che può essere rilevata all'interno di un campione, e il LOQ, ovvero la più bassa concentrazione di analita che può essere quantificata dal metodo con una imprecisione corrispondente a un CV ≤20%, sono stati stimati utilizzando la DS della risposta di cinque campioni di controllo. Il LOQ rappresenta la concentrazione a cui il segnale è maggiore di 10 volte la DS del segnale del campione di controllo (privo delle sostanze oggetto della ricerca) al tempo di ritenzione dell'analita in esame. Il LOD è la concentrazione a cui il segnale è maggiore di 3 volte tale DS. La linearità del metodo, cioè la sua capacità di dare risultati che sono direttamente proporzionali alla concentrazione degli analiti nei campioni all'interno dell'intervallo di concentrazioni riportato, è stata valutata attraverso lo studio della regressione lineare, valutando se l'equazione che lega le due variabili è lineare e se la retta ha intercetta vicino a zero. L'imprecisione, definita come il grado di accordo fra risultati ottenuti con un procedimento di analisi in condizioni ben specificate, è espressa come DS relativa percentuale (CV) delle misure ripetute. L'imprecisione, determinata per tre ripetizioni del calibratore superiore, medio ed inferiore non doveva eccedere il 20%. La misura dell'errore sistematico o "bias definisce l'accordo tra il valore misurato e il valore vero o accettato come tale. I valori medi del "bias", espressi come errore percentuale (Err%), non dovevano eccedere il ±20% del valore atteso. Anche l'inesattezza è stata valutata analizzando tre ripetizioni del calibratore superiore, medio e inferiore. Il "carry-over" o effetto di trascinamento, cioè l'influenza di un campione precedente sul successivo, è stato valutato attraverso l'analisi di un campione di controllo iniettato dopo il campione con la concentrazione corrispondente a 2000 µg/L, due volte superiore alla concentrazione più alta della curva di calibrazione degli analiti di interesse. Se l'analisi produce un risultato inferiore al LOD, il "carry-over" del metodo è considerato accettabile.

Le matrici biologiche contengono molte sostanze endogene che possono interferire con le analisi delle sostanze ricercate, rischiando di coeluire con esse o di generare uno ione-frammento con la stessa massa, con conseguente alterazione (aumento o diminuzione) della risposta strumentale, generando il cosiddetto "effetto matrice". Per valutare l'effetto matrice, il recupero analitico e l'efficienza del processo erano preparate tre serie di campioni di controllo: il gruppo 1 è rappresentato da soluzioni standard dei vari analiti disciolti nella fase mobile; il gruppo 2 era preparato con campioni di latte di controllo prelevati da cinque donatori diversi, sottoposti al processo di estrazione, a cui successivamente si aggiungevano le soluzioni standard degli analiti alla stessa concentrazione del gruppo 1; infine, il gruppo 3 era preparato con campioni di latte di controllo prelevati dagli stessi cinque donatori, a cui gli standard degli

Tabella 1
Parametri di acquisizione nella cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS)

Analita	Tempo di ritenzione (min)	Transizioni ("multiple reaction monitoring")					
		Quantificazione			Conferma		
		m/z	CV (V)[a]	CE (eV)[b]	m/z	CV (V)[a]	CE (eV)[b]
COT	5,6	177 → 80	25	18	177 → 146	25	18
CAF	6,1	195 → 138	30	20	195 → 110	30	20
NIC	8,5	163 → 132	25	20	163 → 80	25	25
MOR	6,6	286 → 286	45	5	286 → 165	45	40
6-MAM	9,1	328 → 328	35	5	328 → 165	35	35
COD	9,5	300 → 300	47	5	300 → 165	47	43
MDA	6,9	180 → 105	20	11	180 → 163	20	15
AM	7,1	136 → 91	20	15	136 → 119	20	9
MDMA	7,7	194 → 163	20	15	194 → 105	20	23
MA	8,1	150 → 91	20	18	150 → 119	20	10
BZE	7,2	290 → 168	30	25	290 → 105	30	29
COCA	11,7	304 → 182	30	25	304 → 82	30	34
CE	12,4	318 → 196	25	20	318 → 168	25	20
EDDP	11,3	278 → 234	50	25	278 → 249	50	35
MTD	13,4	310 → 265	20	15	310 → 105	20	25
THC-COOH	14,8	345 → 327	30	16	345 → 193	30	28
THC-OH	15,7	331 → 193	30	22	331 → 201	30	22
THC	17,5	315 → 193	30	22	315 → 123	30	30
NENC	6,9	191 → 120	25	20			
MDPA	9,3	222 → 163	20	20			
NLR	11,5	312 → 312	40	10			
JWH-018	16,2	342 → 155	35	25			

[a]*CV (V), Collision voltage (Volt).*
[b]*CE (eV), Collision energy (elettronVolt).*
COT, cotinina; CAF, caffeina; NIC, nicotina; MOR, morfina; 6-MAM, 6-monoacetilmorfina; COD, codeina; MDA, 3,4-metilenediossiamfetamina; AM, amfetamina; MDMA, 3,4-metilenediossimetamfetamina; MA, metamfetamina; BZE, benzoilecgonina; COCA, cocaina; CE, cocaetilene; EDDP, 2-etilene-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina; MTD, metadone; THC-COOH, 11-nor-carbossi-Δ9-tetraidrocannabinolo; TCH-OH, 11-idrossi-Δ9-tetraidrocannabinolo; THC, -Δ9-tetraidrocannabinolo; NENC, N-etilnorcotinina; MDPA, 3,4-metilenediossipropilamfetamina; NLF, nalorfina; JWH-C18, naftalen-1-il-(1-pentilindolo-3-il)-metanone.

analiti vengono aggiunti prima del processo di estrazione (37). Le differenze riscontrate nei risultati ottenuti tra i campioni dei gruppi 2 e 3 (aggiunta degli standard prima e dopo il trattamento) evidenziano il recupero del processo di estrazione dei campioni di latte, mentre le differenze rilevate nei risultati ottenuti per i campioni dei gruppi 1 e 2 indicano l'entità dell'effetto matrice nei cinque diversi tipi di latte; l'efficienza totale del processo é data dal confronto tra i risultati ottenuti nel gruppo 3 rispetto al gruppo 1. La stabilità in matrici biologiche è funzione delle condizioni di conservazione (luce, temperatura), delle proprietà chimiche del farmaco e della matrice. Le prove di stabilità sono necessarie per valutare la stabilità degli analiti in esame durante il campionamento, il trattamento e la conservazione a diverse temperature. La stabilità è stata valutata dopo tre cicli di congelamento/scongelamento, utilizzando i calibratori superiori, medi e inferiori, e analizzanzo tre ripetizioni degli stessi dopo conservazione a -20 °C per uno, tre e sei mesi. La stabilità viene misurata come la variazione tra la concentrazione degli analiti dopo conservazione e la concentrazione degli analiti analizzati subito dopo la preparazione. La variazione non deve superare il 10%.

Raccolta e preparazione dei campioni

Il metodo è stato applicato a 400 campioni di latte provenienti dalla più grande banca del latte spagnola situata presso l'Ospedale Universitario "12 de Octubre" di Madrid. Una volta raccolto, il latte di ogni madre è stato pastorizzato, aliquotato e conservato a -20 °C. Per verificare l'eventuale effetto della pastorizzazione, 34 campioni sono stati analizzati sia prima che dopo il processo di pastorizzazione. Al momento della donazione, alle madri è stato chiesto di rispondere ad un questionario

con domande riguardanti l'abitudine al fumo, il consumo di bevande contenenti caffeina e il consumo di farmaci. Le madri hanno firmato un consenso informato e il Comitato Etico ha approvato il protocollo per la donazione del latte. Poiché il latte materno rappresenta la principale fonte di esposizione da parte del lattante ad agenti infettivi o tossici, la banca del latte spagnola ha raccolto solo latte proveniente da madri che non erano affette da patologie e che non erano sieropositive ad alcuna infezione virale, che dichiaravano di non avere assunto nessun farmaco, né alcuna sostanza d'abuso, di non fumare e non consumare caffé e alcol.

Per verificare l'affidabilità del metodo messo a punto, campioni di latte materno provenienti da due madri tossicodipendenti, che dichiaravano una il consumo di cocaina e l'altra di cannabis, e un campione di una madre in trattamento di mantenimento con metadone sono stati raccolti presso l'Hospital del Mar di Barcellona.

RISULTATI

Cromatografia e validazione del metodo

I cromatogrammi ottenuti dopo l'estrazione di latte materno, a cui sono stati aggiunti tutti gli analiti oggetto dell'indagine, e i cromatogrammi di campioni reali di latte sono mostrati nella Figura 1 e nelle Figure 2, 3 e 4.

Il metodo è risultato lineare nell'intervallo di concentrazione riportato per tutti i composti analizzati. I coefficienti di determinazione, la pendenza e l'intercetta della retta di calibrazione e i valori di LOD e di LOQ per tutti gli analiti sono riportati nella Tabella 2.

L'imprecisione e l'inesattezza sono risultate sempre <20% e nessun picco interferente dovuto a sostanze endogene è stato osservato nei campioni del controllo analizzati. I campioni di controllo iniettati dopo il punto più alto delle curve di calibrazione non hanno presentato alcuna traccia di "carry-over".

I dati su l'effetto matrice, il recupero e l'efficienza del processo estrattivo sono riportati nella Tabella 3.

Nessuna degradazione è stata osservata dopo i tre cicli di congelamento/scongelamento (differenze rispetto alle concentrazioni iniziali erano <10%). Risultati simili (differenze rispetto al concentrazione iniziale sempre inferiori al 10%) sono stati ottenuti nei test di stabilità a medio e a lungo termine. Allo stesso modo, nessuna degradazione significativa è stata osservata dopo il processo di pastorizzazione.

Determinazione di campioni di latte materno

Il metodo è stato applicato a 400 campioni di latte materno provenienti dalla banca di latte spagnola. Nessuno degli analiti in esame è stato trovato nei campioni analizzati, a parte la CAF (Figura 5), che era quantificabile nel 17,6% dei campioni di latte con un intervallo di concentrazioni da 295,1 a 2190,8 µg/L. Per quanto riguarda i 34 campioni raccolti prima e dopo processo di pastorizzazione non è stata osservata nessuna differenza di concentrazione di CAF, l'unico analita presente in questi campioni. Nel campione di latte materno della madre che dichiarava il consumo di cocaina è stata rilevata solo la presenza di COCA (5 µg/L), mentre né BZE né altri metaboliti sono stati

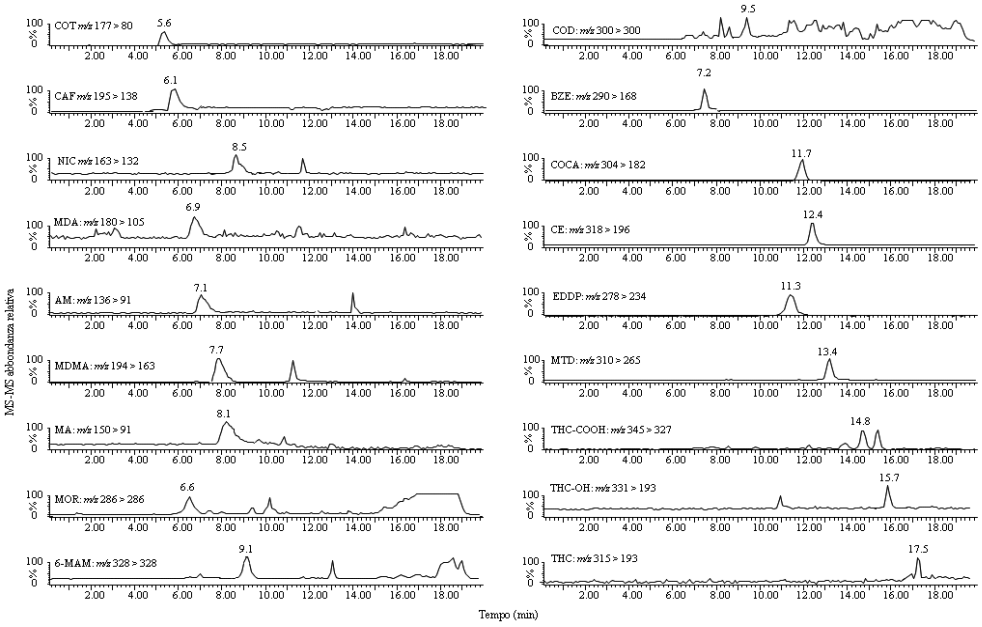


Figura 1

Cromatogramma LC-MS/MS di un campione di latte materno a cui sono stati aggiunti 6 µg/L di morfina (MOR), 6-monoacetilmorfina (6-MAM), codeina (COD), metamfetamina (MA), benzoilecgonina (BZE), cocaina (COCA), Δ9-tetraidrocannabinolo (THC), 11-idrossi-Δ9- tetraidrocannabinolo (TCH-OH), 11-nor-carboxy-Δ9-tetraidrocannabinolo (THC-COOH) e 12 µg/L di cotinina (COT), caffeina (CAF), nicotina (NIC), 3,4-metilenediossiamfetamina (MDA), amfetamina (AP), 3,4 metilenediossimetamfetamina (MDMA), cocaetilene (CE), metadone (MTD) e 2-etilene-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP).

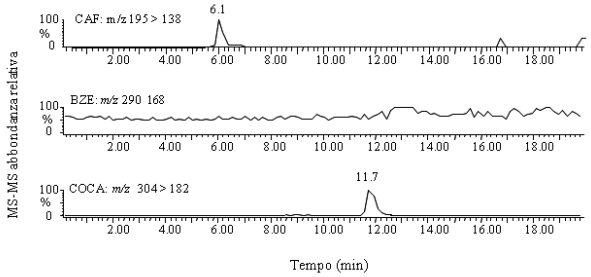


Figura 2
Cromatogramma LC-MS/MS di un campione di latte materno contenente cocaina (COCA, 5 µg/L) e caffeina (CAF, 539,3 µg/L).

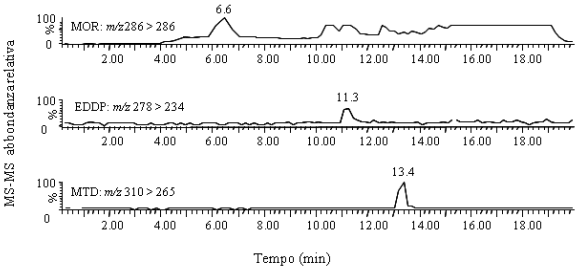


Figura 3
Cromatogramma LC-MS/MS di un campione di latte materno contenente morfina (MOR, 7 µg/L), 2-etilene-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidine (EDDP, 8 µg/L) e metadone (MTD, 97 µg/L)

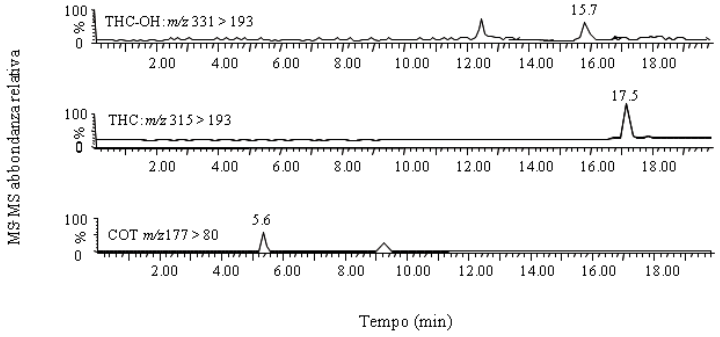


Figura 4
Cromatogramma LC-MS/MS di un campione di latte materno contenente Δ9-tetraidrocannabinolo (THC, 86 µg/L), 11-idrossi-Δ-9-tetraidrocannabinolo (TCH-OH, 5 µg/L) e cotinina (COT, 51 µg/L).

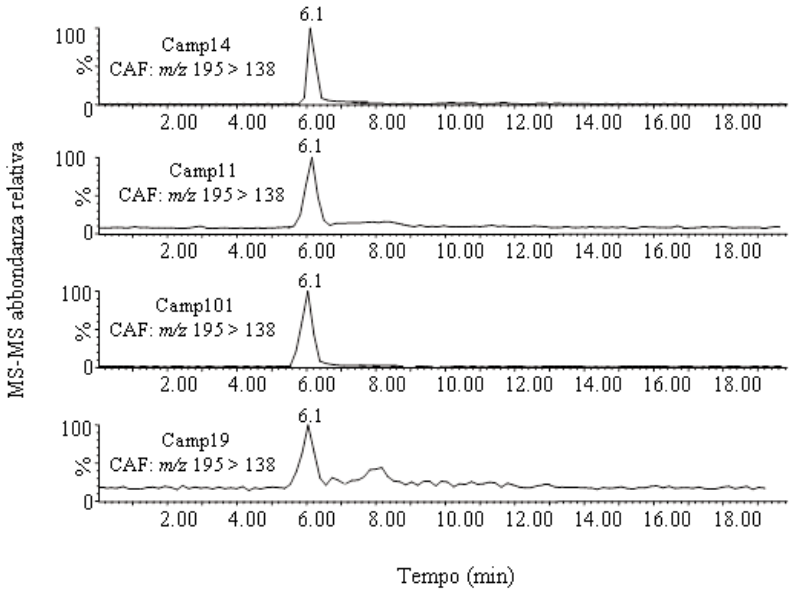


Figura 5
Esempi di cromatogramma LC-MS/MS di campioni di latte materno contenenti caffeina (CAF): Camp14 (CAF ,1122,6 µg/L), Camp11 (CAF, 551,4 µg/L), Camp101 (CAF, 2051,9 µg/L) e Camp19 (CAF, 301,1 µg/L).

Tabella 2
Linearità, limiti di rilevazione (LOD) e limiti di quantificazione (LOQ) del metodo proposto

Analita	Pendenza ± DS	Intercetta ± DS	Coefficiente di determinazione (r^2) ± DS	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
COT	0,028 ± 0,002	-0,226 ± 0,131	0,990 ± 0,006	2,0	7,0
CAF	0,002 ± 0,001	0,176 ± 0,036	0,992 ± 0,002	3,0	10,0
NIC	0.0008 ± 0,0002	0,036 ± 0,020	0,992 ± 0,002	3,0	10,0
MOR	0,0007 ± 0,0002	0,004 ± 0,006	0,995 ± 0,002	1,5	5,0
6-MAM	0,006 ± 0,001	-0,002 ± 0,013	0,994 ± 0,001	1,0	5,0
COD	0,005 ± 0,002	-0,005 ± 0,019	0,996 ± 0,004	1,0	5,0
MDA	0,0005 ± 0,0001	0,006 ± 0,006	0,993 ± 0,002	2,0	7,0
AM	0,0023 ± 0,0003	0,019 ± 0,007	0,994 ± 0,003	2,0	7,0
MDMA	0,003 ± 0,001	-0,022 ± 0,063	0,990 ± 0,005	2,5	8,0
MA	0,011 ± 0,002	0,100 ± 0,079	0,992 ± 0,006	1,0	5,0
BZE	0,0006 ± 0,0002	-0,005 ± 0,002	0,991 ± 0,002	1,0	5,0
COCA	0,002 ± 0,001	0,036 ± 0,014	0,994 ± 0,003	1,0	5,0
CE	0,005 ± 0,001	0,103 ± 0,053	0,991 ± 0,001	1,9	7,0
MTD	0,010 ± 0,004	0,144 ± 0,075	0,991 ± 0,001	2,0	7,0
EDDP	0,004 ± 0,001	0,034 ± 0,061	0,992 ± 0,004	2,5	8,0
THC-COOH	0,002 ± 0,001	-0,026 ± 0,029	0,992 ± 0,004	1,0	5,0
THC-OH	0,0003 ± 0,0001	-0,005 ± 0,004	0,994 ± 0,003	1,5	5,0
THC	0,0001 ± 0,00002	0,002 ± 0,003	0,992 ± 0,004	1,5	5,0

Per le abbreviazioni vedere Tabella 1.

Tabella 3
Effetto matrice, recupero ed efficienza del processo estrattivo del metodo proposto

Analita	Effetto matrice (%)			Recupero (%)			Efficienza estrazione (%)		
	Controllo basso	Controllo medio	Controllo alto	Controllo basso	Controllo medio	Controllo alto	Controllo basso	Controllo medio	Controllo alto
COT	98,1	94,4	95,1	72,9	72,0	77,4	71,5	68,0	73,6
CAF	104,4	105,4	104,9	61,4	56,2	59,6	64,1	59,2	62,5
NIC	90,0	96,0	91,9	52,0	55,8	54,6	46,8	53,6	50,2
MOR	95,1	96,1	100,2	66,9	70,7	63,5	63,7	67,9	63,6
6-MAM	90,5	90,8	90,6	82,9	83,6	84,0	75,0	75,9	76,1
COD	95,0	94,9	91,1	77,9	83,2	83,2	74,0	79,0	75,8
MDA	88,0	82,8	85,7	68,3	70,4	64,1	60,1	58,3	54,9
AM	103,2	102,6	105,0	56,7	54,0	51,6	58,5	55,4	54,2
MDMA	94,7	97,1	98,0	72,6	71,5	69,0	68,8	69,4	67,6
MA	94,5	92,5	95,8	67,9	70,8	65,3	64,2	65,5	62,6
BZE	94,0	92,2	87,4	62,0	61,9	66,4	58,3	57,1	58,0
COCA	93,8	93,2	95,2	81,9	83,0	75,3	76,8	77,4	72,1
CE	85,1	88,0	87,6	86,5	82,4	82,4	73,6	72,5	72,2
MTD	77,6	71,1	75,6	73,9	85,4	72,8	57,4	60,7	55,0
EDDP	114,8	116,6	113,0	65,5	64,2	64,1	75,2	74,8	72,4
THC-COOH	92,1	94,1	92,8	56,0	53,2	55,6	51,6	50,1	51,6
THC-OH	104,8	105,1	102,6	57,8	59,9	59,3	60,6	63,0	60,8
THC	88,0	91,8	91,0	59,9	59,8	63,5	52,7	54,9	57,8

Per le abbreviazioni vedere Tabella 1.

rilevati. Il campione è risultato positivo anche alla CAF (539,3 µg/L) (Figura 2). Per quanto riguarda la madre consumatrice di cannabis, sono stati rilevati THC (86 µg/L) e il THC-OH (5 µg/L) nel suo campione di latte, con la presenza, inoltre, della COT (51 µg/L), metabolita della nicotina. Il THC-COOH, metabolita acido del THC, non era presente in questo campione (Figura 4). Infine, nel latte materno della madre con dipendenza da eroina in trattamento metadonico è stata trovata, insieme al MTD (97 µg/L) e al suo metabolita EDDP (8 µg/L), anche una bassa concentrazione di MOR (7 µg/L) (Figura 3).

DISCUSSIONE

Ci sono ampie evidenze in letteratura che l'allattamento al seno è vantaggioso sia per soddisfare le esigenze nutrizionali che quelle immunologiche dei bambini sia nati a termine che prematuri. Il latte dovrebbe provenire dalla madre del neonato, ma a volte questo non è possibile. Le madri di neonati pretermine o con bambini in terapia intensiva sono spesso incapaci o semplicemente non producono latte sufficiente per i bisogni del loro bambino. In questi casi il latte della banca del latte umano può essere una valida alternativa. Tuttavia, a causa della grande diffusione del consumo di sostanze psicoattive lecite e non nella popolazione in età fertile, è possibile che il latte donato possa contenere sostanze nocive per i neonati.

Per la ricerca nel latte umano delle sostanze farmacologicamente attive lecite (tabacco e caffeina) e illecite (oppiacei, metadone, cocaina, amfetamine e cannabinoidi) più comunemente utilizzate e/o abusate in questo studio é stata messa a punto una metodologia analitica in LC-MS/MS per la simultanea estrazione e determinazione di tali sostanze. Con la metodologia validata sono stati esaminati campioni di latte materno provenienti dalla più grande banca del latte spagnola, situata presso l'ospedale universitario “12 de Octubre”, la prima a richiedere l’analisi tossicologica dei propri campioni al fine di verificare la presenza di sostanze psicoattive lecite o illecite e campioni di latte di madri tossicodipendenti provenienti dall’Hospital del Mar di Barcellona, che da anni possiede una partnership scientifico-metodologica con l’Istituto Superiore di Sanità per l’analisi di sostanze d’abuso e metaboliti su diverse matrici biologiche ai fini di un accertamento oggettivo di biomarcatori di esposizione prenatale, neonatale, pediatrica e nella età adulta a sostanze psicoattive.

Tutti i campioni di latte da noi analizzati, provenienti della banca di latte umano spagnola, hanno dato risultato negativo per la presenza delle principali sostanze d'abuso; questo risultato, verificato prima e dopo il processo di pastorizzazione, ci rassicura sulla qualità del latte e sul funzionamento delle banche. Il 18% dei campioni conteneva CAF. Questo risultato è in accordo con studi precedenti (16-19), dove la concentrazione di CAF nel latte materno proveniente da donne consumatrici di bevande contenenti caffeina variava tra 47 e 4000 µg/L. Anche se la CAF è considerata compatibile con il periodo di allattamento (38), elevate quantità sembrano avere effetti sul lattante, per cui è consigliato di limitare il consumo a meno di 300 mg/die (circa tre tazzine di caffè) durante l'allattamento (5).

La metodologia messa a punto si é rivelata utile anche per valutare se nel latte delle madri tossicodipendenti erano presenti sostanze (e/o loro metaboliti) diverse da quelle da loro dichiarate. Nel campione di latte raccolto dalla madre che dichiarava di consumare cocaina è stata rilevata la sola presenza di COCA. Questo perché, essendo la COCA una sostanza più lipofila del suo metabolita (BZE), tende a distribuirsi meglio nel latte materno ricco in lipidi (22). Inoltre, la concentrazione di COCA, ed eventualmente quella della BZE, nel latte materno è in funzione della relazione temporale tra l'uso di cocaina e la raccolta del campione. Le concentrazioni di COCA nel latte raggiungono livelli elevati se le madri che allattano ne fanno regolarmente uso, per cui l'allattamento al seno non è assolutamente sicuro. Il campione di latte raccolto dalla madre che dichiarava di fumare cannabis ha evidenziato la presenza di THC e THC-OH e della COT, confermando l’uso di cannabis in associazione al tabacco. Infine, la presenza di MOR a basse concentrazioni nel latte della madre in terapia di mantenimento con MTD dimostra una possibile ricaduta nel consumo di oppiacei.

L’analisi di screening per la ricerca di sostanze d'abuso nel latte donato prima di essere utilizzato è estremamente importante. Il metodo che abbiamo descritto ha il vantaggio di quantificare simultaneamente un gran numero di sostanze psicoattive lecite e illecite potenzialmente dannose per il neonato. I 400 campioni analizzati, dei quali solo alcuni contengono CAF, provano che il metodo sviluppato non produce falsi positivi, mentre i tre campioni di latte da donne tossicodipendenti dimostrano che il metodo non dà falsi negativi e che le droghe assunte si ritrovano come tali o come loro metaboliti in tale matrice biologica.

Sebbene il latte è donato e non acquistato, ai costi di prelievo, pastorizzazione, stoccaggio andrebbe aggiunto il costo di un eventuale screening tossicologico. Un metodo validato e reso disponibile in un laboratorio di II° livello che si occupa di analisi di conferma in farmacotossicologia, anche con scopi medico-legali, tende a ridurre i costi di queste analisi. Un’estrazione singola per tutti gli analiti, che richiede una piccola quantità di latte, offre risparmio in tempo e risorse rispetto alle procedure di estrazione e analisi di singole classi di farmaci. L’estrazione unica e la piccola quantità di materiale biologico utilizzato consentono inoltre di ripetere le analisi o di effettuare prove supplementari.

In conclusione, il metodo descritto permette, mediante una metodologia in LC-MS/MS, la contemporanea determinazione delle più comuni sostanze psicoattive lecite e illecite nel latte umano. Il metodo presenta un’adeguata linearità e un’inaccuratezza nei limiti stabiliti a livello internazionale. Le mamme che allattano sono spesso riluttanti ad ammettere di fare uso di droga o potrebbero addirittura non essere a conoscenza del fatto che stanno

utilizzando una sostanza psicoattiva. Pertanto, la ricerca di sostanze psicoattive lecite o illecite nel latte materno può fornire informazioni utili per un'adeguata consulenza materna e per permettere un trattamento immediato e il successivo "follow-up" medico del neonato.

RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato sostenuto dal N.4305005818 - Red SAMID, Instituto Carlos III (ISCIII), Madrid, Spagna. Gli autori ringraziano le Dott.sse Rita Di Giovannandrea e Donatella Mattioli per il loro supporto tecnico.

BIBLIOGRAFIA

1. Wight NE. Donor human milk for preterm infants. J Perinatol 2001;21:249-54.
2. Raisler J, Alexander C, O'Campo P. Breast-feeding and infant illness: a dose-response relationship? Am J Public Health 1999;89:25-30.
3. Riordan JM. The cost of not breastfeeding: a commentary. J Hum Lact 1997;13:93-7.
4. Dewey KG, Heinig MJ, Nommsen-Rivers LA. Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants. J Pediatr 1995;126:696-702.
5. Fríguls B, Joya X, García-Algar O, et al. A comprehensive review of assay methods to determine drugs in breast milk and the safety of breastfeeding when taking drugs. Anal Bioanal Chem 2010;397:1157-79.
6. Atkinson HC, Begg EJ, Darlow BA. Drugs in human milk. Clinical pharmacokinetic considerations. Clin Pharmacokin 1988;14:217-40.
7. American Academy of Pediatrics Committee on Drugs. The transfer of drugs and other chemicals into human milk. Pediatrics 2001;108:776-89.
8. Italian Association of Human Milk Banks Associazione Italiana Banche del Latte Umano Donato (AIBLUD: www.aiblud.org), Arslanoglu S, Bertino E, Tonetto P, et al. Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. J Matern Fetal Neonatal Med 2010;23:1-20.
9. Howard CR, Lawrence RA. Drugs and breastfeeding. Clin Perinatol 1999;26:447-78.
10. Yoshida K, Smith B, Craggs M, et al. Neuroleptic drugs in breast-milk: a study of pharmacokinetics and of possible adverse effects in breast-fed infants. Psychol Med 1998;28:81-91.
11. Lewellyn A, Stowe ZN. Psychotropic medications in lactation. J Clin Psychiatry 1998;59:41-52.
12. Luck W, Nau H. Nicotine and cotinine concentrations in serum and milk of nursing smokers. Br J Clin Pharmacol 1984;18:9-15
13. Page-Sharp M, Hale TW, Hackett LP, et al. Measurement of nicotine and cotinine in human milk by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. J Chromatogr B 2003;796:173-80.
14. Ilett KF, Hale TW, Page-Sharp M, et al. Use of nicotine patches in breast-feeding mothers: transfer of nicotine and cotinine into human milk. Clin Pharmacol Ther 2003;74:516-24.
15. Dahlstrom A, Ebersjo C, Lundell B. Nicotine exposure in breastfed infants. Acta Paediatr 2004;93:810-6.
16. Aresta P, Palmisano F, Zambonin CG. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, theophylline, paraxanthine and nicotine in human milk by liquid chromatography with diode array UV detection. Food Chem 2005;93:177-81.
17. Pellegrini M, Marchei E, Rossi S, et al. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk. Rapid Commun Mass Spectrom 2007;21:2693-703.
18. Stavchansky S, Combs A, Sagraves R, et al. Pharmacokinetics of caffeine in breast milk and plasma after single oral administration of caffeine to lactating mothers. Biopharm Drug Dispos 1988;9:285-99.
19. Blanchard J, Weber CW, Shearer LE. HPLC analysis of methylxanthines in human breast milk. J Chromatogr Sci 1990;28:640-2.
20. Oo CY, Burgio DE, Kuhn RC, et al. Pharmacokinetics of caffeine and its demethylated metabolites in lactation: predictions of milk to serum concentration ratios. Pharm Res 1995;12:313-6.
21. Perez-Reyes M, Wall ME. Presence of delta9-tetrahydrocannabinol in human milk. N Engl J Med 1982;307:819-20.
22. Dickson PH, Lind A, Studts P, et al. The routine analysis of breast milk for drugs of abuse in a clinical toxicology laboratory. J Forensic Sci 1994;39:207-14.
23. Winecker RE, Goldberger BA, Tebbett IR, et al. Detection of cocaine and its metabolites in breast milk. J Forensic Sci 2001;46:1221-3.
24. Steiner E, Villen T, Hallberg M, et al. Amphetamine secretion in breast milk. Eur J Clin Pharmacol 1984;27:123-4.
25. Ilett KF, Hackett LP, Kristensen JH, et al. Transfer of dexamphetamine into breast milk during treatment for attention deficit hyperactivity disorder. Br J Clin Pharmacol 2007;63:371-5.
26. Bartu A, Dusci LJ, Ilett KF. Transfer of methylamphetamine and amphetamine into breast milk following recreational use of methylamphetamine. Br J Clin Pharmacol 2009;67:455-9.
27. Geraghty B, Graham EA, Logan B, et al. Methadone levels in breast milk. J Hum Lact 1997;13:227-30.
28. McCarthy JJ, Posey BL. Methadone levels in human milk. J Hum Lact 2000;16:115-20.
29. Choo RE, Jansson LM, Scheidweiler K, et al. A validated liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization–tandem mass spectrometric method for the quantification of methadone, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP), and 2-ethyl-5-methyl-3,3-diphenylpyroline (EMDP) in human breast milk. J Anal Toxicol 2007;3:265-9.
30. Nikolaou PD, Papoutsis II, Maravelias CP, et al. Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of methadone and its major metabolites (EDDP and EMDP) in human breast milk. J Anal Toxicol 2008;32:478-84.
31. Meny RG, Naumburg EG, Alger LS, et al. Codeine and the breastfed neonate. J Hum Lact 1993;9:237-40.
32. Baka NE, Bayoumeu F, Boutroy MJ, et al. Colostrum morphine concentrations during postcesarean intravenous patient-controlled analgesia. Anesth Analg 2002;94:184-7.
33. Couchman L, Morgan PE. LC-MS in analytical toxicology: some practical considerations. Biomed Chromatogr 2011;25:100-23.
34. Peters FT. Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. Clin Biochem 2011;44:54-65.
35. 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 Biologics Evaluation and Research (CBER), May 2001. http://www.fda.gov/

cder/guidance/4252fnl.htm.
36. The European Agency for the evaluation of medicinal products. ICH Topic Q 2 B validation of analytical procedures: Methodology. London: ICH Technical coordination, 1996.
37. Matuszewski BK, Costanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Anal Chem 2003;75:3019-30.
38. American Academy of Pediatrics. Committee on drugs. Transfer of drugs and other chemicals into human milk. Pediatrics 2001;108:776-89.