

## L'utilizzo della matrice urinaria in tossicologia forense

Gerolama Maria Ciancio<sup>1</sup>, Manuela Pellegrini<sup>1</sup>, Paolo Berretta<sup>1</sup>, Adele Minutillo<sup>1</sup>, Pasqualina Castaldo<sup>2</sup>, Francesco Paolo Busardò<sup>2</sup>, Maria Concetta Rotolo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, Roma

<sup>2</sup>Dipartimento di Eccellenza - Scienze Biomediche e Sanità Pubblica Università Politecnica delle Marche, Ancona

### ABSTRACT

#### The use of urine matrix in forensic toxicology

The analysis of conventional (such as blood and urine) and unconventional (such as hair, saliva, sweat) biological matrices allows to detect substances of abuse at different time windows of exposure and provides an important support to forensic toxicology examinations. In this review, the use of the urine matrix in the determination of psychoactive substances and the employed analytical techniques are reported, identifying their advantages and disadvantages, considering also the challenges faced in the investigation on New Psychoactive Substances (NPS). Urine samples are the prevalently used in clinical and forensic toxicology for a number of reasons: the collection is not invasive, large volumes can be easily obtained, it is possible to analyze exogenous substances and their metabolites after several days of intake. Liquid chromatography and gas chromatography are the most used techniques for screening tests in forensic toxicology since both techniques allow to identify the chemical structure of the analytes under investigation, to distinguish and quantify related substances and their metabolites. In forensic toxicology, the detection of substances of abuse in the urine matrix requires to strictly adhere to definite criteria and steps, from the collection of the sample to its final storage.

**Parole chiave:** matrice urinaria, tossicologia forense, medicina legale

### INTRODUZIONE

#### L'uso delle matrici biologiche in tossicologia forense e le relative finestre temporali

I settori di intervento dei laboratori di tossicologia sia clinica che forense prevedono l'esame di matrici biologiche convenzionali e non convenzionali prelevate da vivente o da cadavere e assumono spesso carattere di prova giudiziaria e pertanto devono possedere precisi requisiti di certezza e di affidabilità (dimostrabili attraverso la documentazione e la rintracciabilità di ogni fase analitica) nonché di trasparenza ed uniformità.

Le analisi con valenza tossicologico forense o medico legale forniscono elementi utili per una corretta diagnosi in diversi ambiti, quali ad esempio:

- accertamento dello stato di ebbrezza o dell'assunzione di sostanze stupefacenti alla guida (d. lgs. 12 agosto 2003, numero 214, artt. 186-187 e successive modifiche: legge 01/08/2003, legge n. 160 del 2/10/2007 e legge n. 125 del 24/07/2008, legge n. 41 del 23/03/2016);
  - accertamenti sui lavoratori le cui mansioni comportano rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi (art. 125 DPR 285/1992, G.U. n. 236 dell'8/10/2008);
  - determinazione requisiti psicofisici per il rilascio del porto d'armi;
  - idoneità a specifiche norme concorsuali e/o contrattuali;
  - diagnosi di uso/abuso nell'ambito dell'affidamento di minori o di adozioni;
  - diagnosi di tossicodipendenza;
  - diagnosi di intossicazione acuta mortale.
- La scelta della matrice biologica, sia convenzionale, come

Corrispondenza a: Francesco Paolo Busardò, Dipartimento di Eccellenza- Scienze Biomediche e Sanità Pubblica Università Politecnica delle Marche Via Conca n.760126 Ancona; Email: f.busardo@univpm.it

Ricevuto: 25.04.2023

Rivisto: 08.05.2023

Accettato: 17.06.2023

Publicato on-line: 14.07.2023

DOI: 10.19186/BC\_2023.050

sangue e urina, che non convenzionale, come le matrici pilifere, la saliva, il sudore, ci permette di evidenziare la finestra temporale in cui le sostanze d'abuso sono rivelabili.

Nei casi in cui si debba valutare l'attualità d'uso di sostanze stupefacenti o psicotrope, e soprattutto la sussistenza degli effetti da esse prodotti, le indagini devono necessariamente essere eseguite su campioni di sangue.

Per la determinazione del consumo "recente" di sostanze stupefacenti o psicotrope il campione d'elezione è l'urina. Tale campione può essere impiegato anche per la determinazione dello stato di assunzione cronica qualora l'analisi sia estesa a più campioni raccolti in giorni diversi e con preavviso all'interessato non superiore alle 24 ore. Il campione di urina offre vantaggi riguardo la possibilità di: campionare grandi volumi e di analizzare sia le sostanze che i loro metaboliti, anche dopo diversi giorni. Inoltre, l'urina viene impiegata come matrice di elezione in molte metodiche e determinazioni. Tra gli svantaggi va considerata la facilità di adulterazione, la mancanza di correlazione con la dose assunta, la scarsa rilevanza clinica dell'analisi quantitativa vista la dipendenza da: dose, via di assunzione, tempo di latenza, stato fisiologico dell'individuo. Fornisce inoltre un dato di presenza/assenza, non fornisce indicazioni sulla quantità di dose assunta e sul momento di assunzione. È importante anche sottolineare la mancanza di correlazione con lo stato psico-fisico del soggetto (1).

Tra le matrici biologiche non convenzionali, la saliva e il sudore possono fornire informazioni sullo stato di tossicodipendenza a breve e a medio termine. La saliva fornisce indicazioni utili sullo stato del soggetto sottoposto ad accertamento analitico al momento del prelievo e quindi la finestra temporale è di poche ore. Il prelievo di saliva è vantaggioso dal punto di vista operativo per la scarsa invasività e la scarsa possibilità di adulterazione. Tra gli svantaggi, invece, possiamo elencare la bassa concentrazione degli analiti, la sensibilità a variazioni di pH, possibili contaminazioni in caso di assunzioni orali o intranasali e la scarsa quantità di campione che può essere raccolto. Negli istituti di pena di alcuni Paesi, il campione di sudore, viene impiegato per il controllo di assunzione pregressa di stupefacenti, considerata la più ampia finestra temporale di permanenza della sostanza nel sudore rispetto alla matrice sangue e la metodica non invasiva del prelievo che avviene attraverso l'utilizzo di cerotti (1).

L'assunzione cronica, come pure comportamenti pregressi di uso/abuso, possono essere verificati attraverso accertamenti sulle matrici pilifere (capelli e/o peli). L'analisi segmentale del capello, infatti, consente di ricostruire pur con margine di incertezza la cronologia dell'assunzione.

### LA MATRICE URINARIA: CARATTERISTICHE E CONTESTI D'IMPIEGO

L'urina è il campione biologico più utilizzato nell'ambito delle analisi chimico-cliniche. Tuttavia, vi sono dei limiti legati alla scarsa rilevanza clinica delle concentrazioni trovate, alla sua facile diluizione e al rischio che possa

essere facilmente adulterata con l'aggiunta di sostanze che ne variano il volume o le sue caratteristiche chimico-fisiche. Per questo si rende necessario controllare alcuni parametri quali il pH, la temperatura e la densità (2). Inoltre la determinazione delle sostanze d'abuso nelle urine non consente di provare un uso cronico o pregresso.

La raccolta del campione urinario deve essere eseguita con il controllo a vista della minzione per garantirne l'autenticità. La raccolta deve essere effettuata in un locale che non comunica con l'esterno, che sia privo di detergenti (3).

Le sostanze d'abuso possono permanere nelle urine per alcuni giorni, ma generalmente il picco massimo di droga si ha nelle 6 ore dall'assunzione. Il tempo medio di rilevamento dipende dalla emivita della sostanza assunta cioè dalla via di assunzione, dal tipo di farmaco (acido o basico), dalla dose e dalla frequenza di utilizzo (Tabella 1).

Pertanto la matrice urinaria viene utilizzata per la determinazione di un "consumo recente" delle sostanze d'abuso con una finestra di rilevabilità temporale di ore-giorni a seconda delle caratteristiche proprie della sostanza in questione come riportato nella Tabella 1. Tuttavia, come già accennato in precedenza, l'urina non fornisce nessuna indicazione relativa alla quantità di sostanza assunta da un soggetto e le concentrazioni delle sostanze eventualmente presenti in essa sono soggette a variazioni dovute alla dose assunta, al tipo di assunzione (orale, inalata, per via endovenosa o rettale), dalla diversa composizione delle sostanze, ma anche dal tempo intercorso tra l'assunzione e la raccolta del campione.

La positività urinaria ad alcune sostanze può anche essere causata dall'assunzione di farmaci che presentano molecole simili per struttura a quelle di abuso, soprattutto per le anfetamine. Tuttavia molti studi sul metabolismo di questi farmaci hanno offerto nuove procedure per individuare metaboliti specifici utili per la differenziazione dalle sostanze d'abuso. I composti di origine (parent drug) sono spesso rilevabili soltanto alcune ore dopo l'ingestione e perciò non sono molto utili come composti target per la differenziazione; tuttavia, nell'ultima fase dell'escrezione possono essere ritrovati nelle urine e in tali campioni non può essere differenziata l'assunzione di sostanze illecite da quella di farmaci (4). Infatti, quando le analisi assumono carattere di prova giudiziaria devono avere requisiti di certezza, affidabilità, trasparenza e uniformità, accompagnate da una documentazione che deve essere dimostrabile e rintracciabile. Di conseguenza, i laboratori devono istituire una catena di custodia dei campioni fino al completamento delle analisi, che includa la refertazione, la conservazione e lo smaltimento del materiale residuo. Tutti i laboratori, pertanto, devono possedere requisiti di sicurezza necessari che riguardano (5,6):

- le competenze del personale
- le procedure di acquisizione del campione
- le procedure di validazione dei metodi
- criteri di identificazione e quantificazione
- i valori soglia (il limite di concentrazione definito in maniera convenzionale per stabilire la positività o la negatività di un campione a livello legale)

**Tabella 1***Durata della rilevabilità media delle sostanze d'abuso nelle urine*

Sostanze	Tempi di rilevabilità
Amfetamine	1-3 giorni dall'assunzione
Barbiturici	Fino a 5 giorni per il pentobarbitale; fino a 8 giorni per il fenobarbitale
Benzodiazepine	Da giorni a mesi in base al consumo di breve o lunga durata
Cannabis	Consumo unico 3 giorni; consumo occasionale 7-8 giorni; consumo cronico fino a 80 giorni
Cocaina	2-3 giorni per la cocaina; fino a 5 giorni per i metaboliti;
Oppiacei	2-4 giorni
Metadone	2-3 giorni
Acido lisergico (LSD)	2-5 giorni

- il monitoraggio interno ed esterno dell'affidabilità analitica e le modalità di stesura ed emissione del referto con interpretazione dei risultati.

#### La preparazione del campione

Ricerca di sostanze d'abuso nella matrice urinaria prevede una serie di passaggi che sono indicati nelle Procedure Operative Standard (POS), dalla raccolta del campione fino alla sua conservazione finale.

La raccolta del campione rappresenta la prima fase dell'indagine chimico tossicologica, la correttezza della sua esecuzione è necessaria per assicurare la validità dei risultati. Successivamente, è necessario porre in atto una corretta applicazione della catena di custodia per tutte le fasi successive, quali il trasporto, la conservazione e l'analisi, al fine di ottenere dati utilizzabili anche in ambito forense.

La sua raccolta deve essere effettuata sotto la supervisione di personale qualificato ed autorizzato, che deve spiegare la procedura di raccolta del campione alla persona sottoposta ad accertamento analitico, compilare il verbale di prelievo, far firmare il consenso informato e compilare il modulo della catena di custodia. In particolare, è necessario verificare:

- il rispetto della privacy e della sicurezza della persona sottoposta ad accertamento analitico;
- l'identità della persona sottoposta ad accertamento analitico;
- la corretta attribuzione del campione alla persona sottoposta ad accertamento analitico;
- che non ci sia stata adulterazione o manomissione del campione;
- che sia stato compilato in ogni sua parte il modulo del consenso informato da parte del soggetto.

Il campione di urine deve essere raccolto in un contenitore sterile. Per eseguire sia l'analisi di screening sia le analisi di conferma, la quantità minima di urine è di 30 mL. L'etichetta identificativa, emessa in fase di registrazione o accettazione del campione biologico,

deve contenere i principali dati anagrafici della persona sottoposta ad accertamento analitico (nome e cognome, data di nascita e codice univoco di identificazione).

Il contenitore del campione deve essere termico e dotato di adeguato elemento refrigerante per il trasporto o la spedizione dei campioni. I campioni di urine devono essere conservati a +4°/+8°C per un massimo di 24 ore, o a -20°C per periodi di tempo superiori alle 24 ore.

È possibile effettuare ulteriori controlli sul campione successivamente alla raccolta (ad esempio, temperatura, peso specifico, determinazione della creatinina, pH). La verifica del peso specifico e/o della misura della creatinina consentono di controllare l'eventuale adulterazione del campione (aggiunta di sostanze estranee o diluizione).

La catena di custodia rende tracciabile ogni movimento del campione, dal momento della sua raccolta all'arrivo nel laboratorio che eseguirà l'analisi, fino allo smaltimento o alla sua conservazione. Quando il campione arriva in laboratorio devono essere immediatamente effettuati i primi controlli sulla sua corretta conservazione e sul rispetto della catena di custodia. In particolare, bisogna verificare l'integrità dell'imballaggio, per escludere la manomissione del campione durante il trasporto e controllare le informazioni apposte sopra i contenitori dei campioni di urine per verificare che corrispondano a quelle annotate nel modulo della catena di custodia.

#### Utilizzo della matrice urinaria con tecniche di I livello

Il primo screening sulla matrice urinaria per la ricerca di sostanze di abuso può essere effettuato sia con tecniche immunochimiche sia con tecniche cromatografiche. I kit commerciali possono differire tra loro per tipologia di anticorpo utilizzato (policlonale o monoclonale) e metodo impiegato (radioimmunologico, immunoenzimatico, immunofluorescenza a luce polarizzata o inibizione di agglutinazione), sensibilità e specificità.

Ogni kit contiene di norma al suo interno tutti i reagenti e calibratori necessari per l'esecuzione delle analisi nonché le procedure operative ed il valore soglia

per stabilire la positività o la negatività del campione in esame.

I metodi immunochimici ad elevata sensibilità, messi a punto e validati per l'analisi sulle urine, permettono di escludere immediatamente i campioni negativi, poiché identificano quei campioni che non contengono la sostanza o la cui concentrazione è al di sotto di un determinato valore soglia (Tabella 2).

Per i campioni positivi è necessario eseguire l'esame di conferma che consiste tipicamente in una tecnica separativa cromatografica accoppiata ad una tecnica di rivelazione quale la spettrometria di massa (cioè con una tecnica di separazione analitica delle sostanze) poiché un risultato dato con un metodo immunochimico, se non convalidato con un test di conferma, è privo di valore medico-legale. Tuttavia, per effettuare uno screening iniziale, possono essere utilizzate anche tecniche di tipo cromatografico. Queste ultime accoppiate alla spettrometria di massa tandem o all'analizzatore a tempo di volo, anche se meno veloci per lo screening di un gran numero di campioni, hanno il vantaggio di poter identificare simultaneamente in un'unica analisi una vasta gamma di analiti differenti. Queste metodiche hanno comunque lo svantaggio di non essere particolarmente diffuse nei laboratori di base ma soprattutto richiedono una elevata e specifica competenza da parte del personale. I metodi immunochimici invece hanno costi contenuti, tempi di esecuzione rapidi, elevata o totale automazione anche se caratterizzati da ridotta specificità e scarsa accuratezza del risultato quantitativo (5).

#### Utilizzo della matrice urinaria con tecniche ifenate di II livello

Le analisi di II livello o di conferma sono analisi effettuate per garantire l'identificazione certa ed eventualmente la quantificazione delle sostanze di interesse (sostanze parenti e/o loro metaboliti) con idonea sensibilità e specificità. Si tratta, infatti, di

metodologie analitiche in grado di identificare in modo certo non soltanto la struttura chimica dell'analita ma anche di distinguere e quantificare sostanze parenti e loro metaboliti. Sono anche in grado di permettere la distinzione di isomeri costituzionali (ad esempio le amfetamine e la fentermina) che hanno stessa formula molecolare ma con atomi legati in modo differente. L'esecuzione di queste analisi si ottiene utilizzando tecniche separative cromatografiche (cromatografia gassosa o liquida) associate alla spettrometria di massa, che identifica i composti attraverso sia il loro peso molecolare sia i frammenti che si formano per collisione con fascio di elettroni ad energia nota o con un gas a pressione elevata, all'interno di una cella di collisione sotto vuoto. Questa tipologia di tecniche definite anche ifenate (dall'inglese hyphenation), prevede l'interfaccia di due strumentazioni che permettono la rilevazione di analiti in tempi brevi anche a concentrazioni minime. Il valore soglia dei test di conferma deve essere posto ad una concentrazione inferiore rispetto a quello dei metodi immunochimici. I campioni, in cui le concentrazioni di una determinata sostanza d'abuso risultino al di sotto dei valori soglia stabiliti per le analisi di conferma, devono essere considerati negativi per la sostanza ricercata (Tabella 3). Al contrario, i campioni che contengono le sostanze d'abuso e/o i loro metaboliti a concentrazioni uguali o superiori ai valori soglia prestabiliti, sono considerati positivi. Normalmente non si rendono necessarie ulteriori analisi, ma il campione, per una eventuale controanalisi, deve essere conservato in apposito congelatore per i tempi previsti dalla legge (5).

#### I METODI DI ANALISI

##### Applicazioni in cromatografia liquida

Le metodiche cromatografiche utilizzate nei laboratori di tossicologia forense sono la Gas Cromatografia (GC) e la Cromatografia Liquida (LC) accoppiate ad un

**Tabella 2**

Valori soglia prestabiliti per i test di screening<sup>1</sup>

Classi di sostanze	Valore SAHMSA ng/mL	Valore soglia <sup>2</sup> ng/mL	Valore soglia GTFI ng/mL
Oppiacei e metaboliti	2000	300	-
Cocaina e metaboliti	150	300	-
Cannabinoidi	50	50	-
Amfetamine e analoghi	500	500	-
Metadone ed 2-etilidina-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP)	-	300	-
Buprenorfina	-	-	-

<sup>1</sup>Valore soglia prestabilito per il metodo utilizzato. Nel caso in cui sia necessario individuare un valore soglia differente da quello suggerito dal produttore, il metodo di screening deve in ogni caso essere sottoposto a rivalidazione nel laboratorio che lo utilizza, mediante uso di calibratori preparati ad hoc

<sup>2</sup>Provvedimento 18/09/2008 per i laboratori con mansioni a rischio

SAHMSA, Substance Abuse and Mental Health Services Administration (<https://www.samhsa.gov/>); GTFI, Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (<https://www.gtfi.it/>).

spettrometro di massa. La cromatografia in fase liquida abbinata alla spettrometria di massa (MS) (LC-MS) è un metodo sensibile per identificare esattamente la quantità di sostanze nelle urine. I vantaggi di questa metodica sono:

- maggiore sensibilità grazie a un valore soglia molto basso;
- maggiore specificità poiché la metodica seleziona e separa le sostanze misurandone anche i frammenti;
- offerta di risultati sia qualitativi che quantitativi per tutte le sostanze analizzate.

L'abbinamento della CL alla MS consente di disporre da un lato un metodo di rilevazione ad altissima sensibilità e dall'altro di trarre vantaggio da una tecnica separativa che consente di analizzare non solo sostanze poco polari, stabili e volatili ad elevate temperature, ma anche sostanze termolabili, idrofile come i metaboliti (per esempio i glucuronidi) delle sostanze d'abuso. Negli ultimi anni, le semplici LC-MS sono state affiancate da quella che viene denominata Cromatografia Liquida ad altissima prestazione associata alla Spettrometria di Massa tandem (Ultra High Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry; UHPLC-MS/MS). Per le sue caratteristiche di elevata specificità e selettività, questa è divenuta uno strumento analitico sempre più diffuso nella pratica clinica (7) ed in tossicologia forense (8,9).

Tale strumento risulta indispensabile anche per la determinazione dell'acido gamma-idrossibutirrico (gamma hydroxy butirric acid, GHB), la cosiddetta droga dello stupro o dei festini, in diverse matrici biologiche, sia per scopi clinici che forensi (10).

L'esigenza di ricercare nella matrice urinaria, a scopo clinico-forense, i metaboliti delle Nuove Sostanze Psicoattive (NPS), soprattutto quelle di ultima generazione, ha portato all'utilizzo di un nuovo tipo di strumentazione, la Spettrometria di Massa ad alta risoluzione per cromatografia liquida ad altissima prestazione (Ultra-High-Performance Liquid Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry; UHPLC/HRMS).

A causa dell'elevata sensibilità e della buona capacità di separazione dell'UHPLC e della sensibilità dell'HRMS, questa tecnica è ampiamente utilizzata per l'identificazione della struttura, la determinazione quantitativa di campioni "sconosciuti", ossia campioni prelevati a pazienti sottoposti ad accertamento per la ricerca di sostanze psicotrope, con evidenti segni di alterazione psicofisica, nei quali il test di screening iniziale eseguito ad esempio in Pronto Soccorso ha dato esito negativo.

L'uso di questa strumentazione permette la determinazione qualitativa della massa esatta delle sostanze d'abuso tramite infusione e la determinazione quantitativa UHPLC-MS (11-13).

Grazie all'elevata sensibilità di queste strumentazioni, molti gruppi di ricerca, con lo scopo di rilevare sostanze mediante iniezione diretta, hanno applicato con successo il metodo, "diluire ed iniettare" nel quale i campioni di urina vengono prima diluiti e successivamente, attraverso l'aggiunta di uno standard interno, iniettati direttamente nel sistema di cromatografia liquida accoppiata a

spettrometria di massa sia essa tandem o ad altissima prestazione (14).

### Applicazioni in gas cromatografia

La GC/MS utilizzata fin dal secolo scorso per la determinazione delle sostanze d'abuso nelle matrici biologiche convenzionali e non convenzionali, è sempre stata considerata una tecnica di elezione per le analisi di conferma con elevata sensibilità ed alto potere separativo riuscendo ad ottenere una sorta di impronta digitale chimica della sostanza, anche a concentrazioni molto basse, e consentendo un risultato legalmente valido ed inequivocabile. Tuttavia, pur essendo uno strumento attualmente presente in quasi tutti i laboratori di farmacotossicologia, ha lo svantaggio di non essere adatta per l'analisi di sostanze non volatili (ad esempio metaboliti urinari idrofili).

Per ovviare a questo problema, è necessario provvedere alla loro derivatizzazione con particolari reagenti che purtroppo sono tossici sia per l'uomo che per l'ambiente (15). Pertanto, viene ampiamente utilizzata per la determinazione delle classiche sostanze d'abuso in tutte le matrici biologiche, compresa l'urina, con metodologie analitiche che prevedono sempre una fase preparativa del campione (estrazione liquido/liquido o estrazione in fase solida mediante colonnine (solid-phase extraction SPE) (16,17). Attualmente gli strumenti GC/MS di ultima generazione ad alta sensibilità permettono l'esecuzione di analisi di screening ad ampio raggio delle sostanze d'abuso classiche ma anche delle NPS), consentendo l'identificazione dello spettro completo di composti target (o bersaglio, cioè quelli che ci si aspetta di identificare nel campione urinario) e non target (non bersaglio, ossia i composti che vengono identificati nonostante non fossero oggetto di identificazione) (11,13).

Anche nel caso della GC come per LC è possibile accoppiare uno spettrometro di massa tandem in modo da aumentare notevolmente la sensibilità e la specificità dello strumento. Attraverso strumentazioni di questo tipo è, quindi, possibile determinare sia qualitativamente che quantitativamente le nuove NPS di ultima generazione ed i loro metaboliti presenti nella matrice urinaria in concentrazioni molto basse (18). Nel caso delle NPS, di cui i metaboliti non sono conosciuti, il metodo di elezione rimane, come già detto precedentemente, l'UHPLC/HRMS (11).

### Urina e Nuove Sostanze Psicoattive: quali sfide

Le NPS rappresentano un gruppo di sostanze che negli ultimi anni si sono aggiunte alle classiche sostanze psicoattive. In generale, sono sostanze di natura sintetica, progettate in alcuni casi come potenziali farmaci ad uso terapeutico, ma nella maggior parte dei casi sono sostanze create come droghe ad uso voluttuario, caratterizzate da proprietà farmacologiche e tossicologiche estremamente insidiose per la salute dei consumatori.

Nella categoria NPS sono raggruppate tutte le sostanze sintetiche con effetti psicotropi come le triptamine, le fenetilamine, i catinoni sintetici, i

**Tabella 3***Valori soglia prestabiliti per gli esami di conferma*

Analita	Valore soglia SAHMSA ng/mL	Valore soglia <sup>1</sup> ng/mL	Requisiti minimi di prestazione <sup>2</sup> GTFI ng/mL
Amfetamina	250	250	2
Metamfetamina	250	250	2
3,4-Metilenediossiamfetamina	250	250	2
3,4-metilenediossimetamfetamina	250	250	2
3,4-metilendioossi-N-etilfetamina	250	250	2
delta-9-tetraidrocannabinolo ( $\Delta$ 9THC)	-	15	1
11-nor-9-carbossi-delta-9- tetraidrocannabinolo ( $\Delta$ 9THC-COOH)	15	15	2
Cocaina	-	100	2
Benzoilecgonina	100	100	2
Morfina	2000	100	2
Codeina	2000	100	2
6-monacetilmorfina	10	100	2
Metadone	-	100	2
2-etilidina-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina	-	-	2
Buprenorfina	-	5	2
Norbuprenorfina	-	-	2

<sup>1</sup>provvedimento 18/09/2008 per i lavoratori con mansioni a rischio<sup>2</sup>le concentrazioni degli analiti nel fluido biologico oggetto di indagine che il laboratorio deve essere in grado di quantificare, con accuratezza, ed atti a valutare l'applicabilità di un metodo rispetto ad una determinata finalità analitica tossicologico-forense, ove non sussistano specifici requisiti normativi (<https://www.gtfi.it/wp-content/uploads/2023/02/LineeGuidaGTFI-MaterialeBiologico-rev06-08giu2022.pdf>)SAHMSA, Substance Abuse and Mental Health Services Administration (<https://www.samhsa.gov/>); GTFI, Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (<https://www.gtfi.it/>).

cannabinoidi sintetici, le perazine, le arilcicloesilammine e gli oppioidi sintetici (19). Sebbene alcune delle sopramenzionate sostanze siano già state inserite nella Tabella I del Testo unico sugli stupefacenti (DPR 309/90) (20), molte altre vengono sintetizzate e immesse sul mercato quasi quotidianamente, spesso semplicemente modificando le molecole stupefacenti e psicotrope già esistenti.

Uno dei problemi principali, legati alla diffusione delle NPS, riguarda la difficoltà del loro riconoscimento analitico, sia in campioni non biologici provenienti da sequestri, sia in campioni biologici, prelevati in casi di intossicazione acuta, potenzialmente correlati al loro consumo che rappresenta la sfida quotidiana dei laboratori di farmacotossicologia analitica. Infatti, mentre per lo screening delle sostanze d'abuso ci si affida a tecnologie analitiche di tipo immunochimico ampiamente standardizzate, il rilevamento in ambito sia clinico che forense delle NPS richiede l'utilizzo di tecniche specifiche e selettive come la GC-MS o GC-MS/MS e LC-MS o LC-MS/MS- per una precisa identificazione ed eventuale quantificazione delle sostanze. Chi lavora in laboratorio deve quindi operare delle scelte analitiche, mirate e quindi più specifiche, o non mirate, e quindi più generiche, ma comunque che permettano di raggiungere un risultato preciso ed affidabile. In particolar modo, l'utilizzo delle matrici urinarie risulta complesso poiché l'identificazione dei metaboliti, di cui molto spesso non si conosce l'identità, non permette di ottenere risultati certi e a tal proposito l'unico strumento a disposizione è rappresentato come già descritto precedentemente, dalla UHPLC-HRMS, strumento di ultimissima generazione che permette attraverso l'elevata sensibilità e l'utilizzo della massa esatta di identificare un ampio numero di metaboliti (11).

Un altro fondamentale problema per l'analisi qualitativa e quantitativa delle NPS e/o metaboliti in matrici biologiche convenzionali e non convenzionali nonché l'analisi delle sole NPS nei reperti non biologici è l'approvvigionamento degli standard chimici puri per sviluppare e validare metodologie analitiche secondo le normative internazionali. A differenza delle sostanze d'abuso classiche e dei loro metaboliti, nel caso delle NPS, gli standard di cui approvvigionarsi sono numerosi e non sempre disponibili sul mercato nazionale e/o internazionale anche per la velocità con cui sostanze sempre diverse sono immesse nel mercato (21).

L'individuazione delle NPS rimane una questione aperta, poiché riguarda un fenomeno in continua evoluzione; nuove molecole sono sempre pronte ad essere inserite nel mercato per soddisfare nuove richieste da parte dei consumatori anche attraverso l'utilizzo di canali web ed in particolar modo negli ultimi anni attraverso siti che operano nel dark-web, ai quali si accede soltanto tramite sistemi di crittografia che rendono difficilissima l'identificazione delle persone coinvolte ed il tracciamento dei relativi pagamenti spesso effettuati in moneta virtuale.

La sfida dei laboratori di farmacotossicologia rimane incentrata sulla rilevazione e identificazione di una varietà di strutture chimiche associate alle NPS, sia nelle

matrici biologiche, urina compresa, in particolar modo appartenenti a soggetti intossicati e/o di casi di morte, sia in matrici non biologiche.

## CONCLUSIONI

Sebbene i risultati dell'analisi delle sostanze d'abuso ottenuti sui campioni di urina non possano essere correlati con lo stato psico-fisico del soggetto al momento del prelievo, la matrice urinaria rimane il campione d'elezione per la determinazione del consumo "recente" delle sostanze stupefacenti e psicotrope con una finestra di rilevabilità temporale di ore-giorni a seconda delle caratteristiche farmacocinetiche della sostanza in questione. L'utilizzo di metodologie analitiche e strumentali di alto livello e di ultima generazione con elevata sensibilità e specificità ne rendono una matrice ampiamente utilizzata nei laboratori di farmacotossicologia poiché attraverso l'analisi dell'urina è possibile completare le informazioni relative anche al metabolismo della singola sostanza con lo studio dei loro metaboliti.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

## BIBLIOGRAFIA

1. Strano Rossi S, Chiarotti M. Matrici non convenzionali in tossicologia forense. In Giusti, V. (ed.). Trattato di medicina legale e scienze affini II ed. CEDAM, Padova 2009: 109-133.
2. Zuccaro P, Marchei E, Pellegrini M, Palmi I, Mortali C, Pichini S. Il dosaggio delle droghe d'abuso in urina e nei capelli: linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità. *EsaDia* 2004;7:10-15.
3. SAMHSA Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing. <https://www.samhsa.gov/workplace/drug-testing-resources> (ultimo accesso: aprile 2023).
4. Mancinelli R, Guiducci MS, Aspetti procedurali e problemi d'interpretazione-AnnIstSuperSanità2002;38:305-13. <https://www.iss.it/documents/20126/955767/383305.1108648227.pdf/a e 8 5 e 4 f c - 7 6 0 5 - c d 6 d - 8 a 0 4 - 4d185d5deb70?t=1575575875480> (ultimo accesso: aprile 2023).
5. Pichini S, Pacifici R. Linee Guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nelle urine. Istituto Superiore di Sanità, 2013. ([https://www.iss.it/documents/20126/1915304/Linee\\_Guida\\_Urine\\_xweb.pdf/644c57ab-deff-451e-6e98-d281a5a5039e?t=1576445696204](https://www.iss.it/documents/20126/1915304/Linee_Guida_Urine_xweb.pdf/644c57ab-deff-451e-6e98-d281a5a5039e?t=1576445696204) (ultimo accesso: aprile 2023).
6. Favretto D, Pichini S, Bucchioni P, Pacifici R. Documento di consenso Gruppo di Studio di Farmacotossicologia Clinica e Doping SIBioC e Gruppo Tossicologi Forensi (GTFI). Modalità per lo svolgimento di indagini di laboratorio per la determinazione delle sostanze d'abuso *Biochim Clin* 2019;43:449-52.
7. Rathod H, Suraj R, Chaudhari N, Patil A.S, Shirkhedka AA. Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. *FJPS* 2019;5:1-26.
8. Barceló B, Gomila I, Rotolo MC, Marchei E, Kyriakou C, Pichini S, et al. Intoxication caused by new psychostimulants: analytical methods to disclose acute and

- chronic use of benzofurans and ethylphenidate. *Int J Legal Med* 2017;131:1543-53.
9. Trana AD, Mannocchi G, Pirani F, Maida N, Gottardi M, Pichini S, et al. A comprehensive HPLC-MS-MS screening method for 77 New Psychoactive Substances, 24 classic drugs and 18 related metabolites in blood, urine and oral fluid. *J Anal Toxicol* 2020;44:769-783.
  10. Busardò FP, Kyriakou C, Marchei E, Pacifici R, Pedersen DS, Pichini S. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for determination of GHB, precursors and metabolites in different specimens: Application to clinical and forensic cases. *J Pharm Biomed Anal* 2017;137:123-31.
  11. Marchei E, Ferri MA, Torrens M, Farré M, Pacifici R, Pichini S, et al. Ultra-High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry and High-Sensitivity Gas Chromatography-Mass Spectrometry screening of classic drugs and new psychoactive substances and metabolites in urine of consumers. *Int J Mol Sci* 2021;22:4000.
  12. Alías-Ferri M, Pellegrini M, Marchei E, Rotolo MC, Pichini S et al. New Psychoactive Substances consumption in opioid-use disorder patients. *Biology (Basel)* 2022;11:645.
  13. Alías-Ferri M, Pellegrini M, Marchei E, Pacifici R, Rotolo MC, Pichini S, et al. Synthetic cannabinoids use in a sample of opioid-use disorder patients. *Front Psychiatry* 2022;13:9561.
  14. Pichini S, Mannocchi G, Gottardi M, Pérez-Acevedo AP, Poyatos L, Papaseit E, et al. Fast and sensitive UHPLC-MS/MS analysis of cannabinoids and their acid precursors in pharmaceutical preparations of medical cannabis and their metabolites in conventional and non-conventional biological matrices of treated individual. *Talanta* 2020;209:120537.
  15. Brettell TA, Lum BJ. Analysis of drugs of abuse by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). *Methods Mol Biol* 2018;1810:29-42.
  16. Marchei E, Colone P, Nastasi GG, Calabrò C, Pellegrini M, Pacifici R, et al. On-site screening and GC-MS analysis of cocaine and heroin metabolites in body-packers urine. *J Pharm Biomed Anal* 2008;48:383-7.
  17. Pacifici R, Pichini S, Pellegrini M, Rotolo M C, Giorgetti R, Tagliabracci A et al. THC and CBD concentrations in blood, oral fluid and urine following a single and repeated administration of "light cannabis". *Clin Chem Lab Med* 2020;58:682-9.
  18. Pichini S, Graziano S, Vari MR, Pellegrini M, Marchei E, Rotolo MC et al. The role of analytical pharmacotoxicology in addressing the main functions of the National Early Warning System on NPS. *Toxicol Anal Clin* 2022;34:S53.
  19. Busardò FP, Pichini S. Molecular Insights on New Psychoactive Substances (NPSs). *Int J Mol Sci* 2022;23:3282.
  20. Italia Decreto-legge n. 36 20 marzo 2014, "Disposizioni urgenti in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza, di cui al decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990, n. 309, nonche' di impiego di medicinali meno onerosi da parte del Servizio sanitario nazionale". G.U. Serie Generale, n. 67 del 21 marzo 2014
  21. Pantano F, Graziano S, Pacifici R, Busardò FP, Pichini S. New Psychoactive Substances: a matter of time. *Curr Neuropharmacol* 2019;17:818-22.