



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense

Sviluppo di una metodica LC-MS/MS per la determinazione
quantitativa di amfetamina, metamfetamina, MDMA ed MDA su
sangue intero e DBS (*Dried Blood Spot*)

Relatore:

Prof. Luca Morini

Correlatrice:

Valentina Martini

Tesi Sperimentale di
Roberta Scarpino

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1. Introduzione.....	1
1.1 Progetto PRIN NO PANIC	1
2. Le amfetamine e i loro derivati	2
2.1 Amfetamina	2
2.1.1 Epidemiologia ed eziologia.....	2
2.1.2 Farmacocinetica.....	3
2.1.3 Farmacodinamica ed epatotossicità	4
2.1.4 Utilizzo dell'amfetamina nel trattamento del disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD).....	5
2.1.5 Effetti avversi	6
2.1.6 Strategie di intervento nell'intossicazione acuta da amfetamine	7
2.2 Metamfetamina	8
2.2.1 Epidemiologia dell'abuso di metamfetamina	9
2.2.2 Meccanismo d'azione molecolare.....	10
2.2.3 Farmacocinetica.....	10
2.2.4 Farmacodinamica	12
2.2.5 Effetti avversi	13
2.2.6 Trattamento della neurotossicità	14
2.3 MDMA e MDA.....	15
2.3.1 Epidemiologia dell'MDMA e dell'MDA.....	16
2.3.2 Origine e primi impieghi dell'MDMA	17
2.3.3 Farmacocinetica.....	18
2.3.4 Farmacodinamica	20
2.3.5 Uso terapeutico dell'MDMA: PTSD e prospettive future.....	21
2.3.6 Effetti collaterali	22
3. Matrice ematica	24
3.1 Il sangue: composizione e proprietà	24
3.1.1 La componente corpuscolata e l'ematocrito.....	25
3.1.2 Volume ematico e regolazione omeostatica	26
3.2 Il sangue come matrice di elezione in tossicologia forense	27
3.2.1 Vantaggi.....	27
3.2.2 Prelievo e gestione dei campioni ematici in ambito tossicologico-forense	27

3.2.3 Limiti del sangue intero in forma liquida.....	28
3.3 Il campionamento a volume ridotto: i <i>Dried Blood Spots</i> (DBS).....	28
3.3.1 Principio della tecnica e modalità di raccolta	29
3.3.2 Vantaggi.....	30
3.3.3 Estrazione degli analiti e fattori critici	30
3.3.4 Limiti	31
4. LC-MS/MS.....	33
4.1 Cromatografia liquida	33
4.2 Fase mobile	35
4.3 Fase stazionaria	36
4.4 Componenti di un sistema LC	37
4.5 Spettrometro di massa	39
5. Scopo della tesi.....	43
6. Materiali e metodi	44
6.1 Sostanze pure e reagenti.....	44
6.2 Vetreria, materiali da laboratorio e strumenti.....	44
6.3 Campioni biologici	45
6.3.1 Preparazione del campione.....	46
6.3.2 Purificazione mediante SPE	47
6.3.3 Caratterizzazione delle sostanze in MS/MS	47
6.3.4 Sviluppo del metodo cromatografico	49
6.3.5 Ottimizzazione dei parametri di ionizzazione in LC-ESI-MS/MS.....	50
6.4 Rette di calibrazione	51
7. Sviluppo dei metodi.....	53
7.1 Studio di selettività.....	53
7.2 Sensibilità analitica	53
7.3 Linearità e variabilità del dato	53
7.4 Accuratezza e precisione	54
7.5 Effetto matrice e recupero.....	54
7.6 Effetto di trascinamento	55
7.7 Stabilità	56
8. Risultati e discussione	57
8.1 Sviluppo e validazione del metodo LC-MS/MS.....	57

8.1.1 Sensibilità analitica.....	57
8.1.2 Linearità, accuratezza e precisione	59
8.1.3 Effetto matrice e recupero	63
8.1.4 Effetto di trascinamento.....	67
9. Conclusioni.....	70
BIBLIOGRAFIA.....	71

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1: Strutture chimiche degli enantiomeri dell'amfetamina: (S)-(+)-amfetamina (destroamfetamina) e (R)-(-)-amfetamina (levoamfetamina) [1].	2
Figura 2: Principali vie metaboliche dell'amfetamina (CYP2D6: citocromo P450 2D6; DBH: dopamina β -idrossilasi; FMO3: monoossigenasi 3 contenente flavina). Adattato da [8, 10].	4
Figura 3: Principali vie metaboliche della metamfetamina. Tratta da [42].	11
Figura 4: Strutture chimiche dell'MDMA (3,4-metilendiossimetamfetamina) e del suo metabolita N-demetilato MDA (3,4-metilendiossiamfetamina).	16
Figura 5: Principali vie metaboliche di MDMA e MDA nell'uomo (COMT: catecol-O-metiltransferasi; UGT: UDP-glucuronosiltransferasi; SULT: sulfotransferasi). Adattato da [91, 109].	19
Figura 6: Composizione del sangue intero dopo centrifugazione. Adattato da [143].	24
Figura 7: Rappresentazione schematica delle fasi di raccolta, conservazione e analisi dei campioni DBS. Adattato da [151, 156].	29
Figura 8: Effetto dell'ematocrito sull'estensione della macchia di sangue e sul volume di sangue contenuto in un disco a diametro fisso. Adattato da [151, 156].	31
Figura 9: Schema a blocchi di un sistema LC-MS/MS. Adattato da [159, 161].	38
Figura 10: Principio di funzionamento di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo in modalità MRM. Adattato da [167, 171].	41
Figura 11: Rappresentazione grafica del gradiente cromatografico (fase A in blu, fase B in rosso)	50
Figura 12: Cromatogrammi relativi ai picchi delle sostanze in esame e dello standard interno (100 ng/mL) in campioni di sangue intero	58
Figura 13: Cromatogrammi relativi ai picchi delle sostanze in esame e dello standard interno (100 ng/mL) in campioni DBS	59
Figura 14: Retta di calibrazione a 7 punti per l'amfetamina nel sangue intero	60
Figura 15: Retta di calibrazione a 7 punti per l'MDMA nel sangue intero	60

Figura 16: Retta di calibrazione a 7 punti per l'MDA nel sangue intero	60
Figura 17: Retta di calibrazione a 7 punti per la metamfetamina nel sangue intero	60
Figura 18: Retta di calibrazione a 7 punti per l'amfetamina in DBS	60
Figura 19: Retta di calibrazione a 7 punti per l'MDMA in DBS	60
Figura 20: Retta di calibrazione a 7 punti per l'MDA in DBS	61
Figura 21: Retta di calibrazione a 7 punti per la metamfetamina in DBS	61
Figura 22: Cromatogrammi relativi all'effetto matrice a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni di sangue intero	64
Figura 23: Cromatogrammi relativi all'effetto matrice a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni DBS	65
Figura 24: Cromatogrammi relativi al recupero a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni di sangue intero	66
Figura 25: Cromatogrammi relativi al recupero a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni DBS	67
Figura 26: Campioni "bianchi" di sangue intero analizzati dopo il punto più alto della retta (1000 ng/mL)	68
Figura 27: Campioni "bianchi" DBS analizzati dopo il punto più alto della retta (1000 ng/mL)	69

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1: Parametri di ionizzazione e transizioni ioniche degli analiti	49
Tabella 2: Parametri di eluizione cromatografica	50
Tabella 3: Parametri di ionizzazione ESI	51
Tabella 4: Valori di LOD e LOQ calcolati per ciascuna molecola analizzata in LC-MS/MS nei campioni di sangue intero	57
Tabella 5: Valori di LOD e LOQ calcolati per ciascuna molecola analizzata in LC-MS/MS nei campioni DBS	57
Tabella 6: Valori di R ² ottenuti per ciascuna curva di calibrazione	59
Tabella 7: Accuratezza e precisione del metodo per tutte le sostanze analizzate nei campioni di sangue intero	61
Tabella 8: Accuratezza e precisione del metodo per tutte le sostanze analizzate nei campioni DBS	62
Tabella 9: Effetto matrice nei campioni di sangue intero	63
Tabella 10: Effetto matrice nei campioni DBS	64
Tabella 11: Recupero nei campioni di sangue intero	65
Tabella 12: Recupero nei campioni DBS	66

1. Introduzione

1.1 Progetto PRIN NO PANIC

Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito del progetto di ricerca PRIN-NO PANIC (*New and Old Psychoactive drugs Abuse and Neuroenhancers use Investigation among Current University Students*), uno studio osservazionale multicentrico, senza finalità di lucro, condotto presso le Università degli Studi di Pavia e di Bologna e finalizzato alla valutazione del consumo di sostanze psicoattive tra gli studenti iscritti ai corsi di laurea in Medicina e Chirurgia.

Lo studio viene condotto durante le sessioni d'esame, periodo caratterizzato da un possibile incremento dello stress percepito e, potenzialmente, da modificazioni nelle abitudini di consumo di sostanze psicoattive. A tale scopo, il protocollo prevede la compilazione di un questionario volto a raccogliere informazioni relative alle caratteristiche dei partecipanti, ai livelli di stress percepito e alle abitudini di consumo di sostanze psicoattive.

Parallelamente alla raccolta dei dati mediante questionario, vengono acquisiti campioni biologici costituiti da matrice cheratinica e sangue raccolto mediante *Dried Blood Spots* (DBS), successivamente sottoposti ad analisi tossicologica mediante tecniche di cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS).

Nell'ambito del presente lavoro di tesi, l'attenzione è rivolta in particolare alla determinazione di amfetamina e di alcuni suoi derivati e composti strutturalmente correlati, quali metamfetamina, 3,4-metilendiossimetamfetamina (MDMA) e 3,4-metilendiossiamfetamina (MDA), nei campioni biologici raccolti nell'ambito dello studio. La determinazione di tali sostanze mediante LC-MS/MS consente di sfruttare l'elevata sensibilità e selettività della tecnica per la ricerca di analiti potenzialmente presenti a basse concentrazioni all'interno di matrici biologiche complesse.

Il lavoro si propone pertanto di descrivere e applicare una metodologia analitica per la determinazione di amfetamina, metamfetamina, MDMA e MDA nei campioni biologici raccolti nell'ambito del progetto PRIN-NO PANIC, con particolare attenzione allo sviluppo e alla valutazione delle prestazioni del metodo mediante LC-MS/MS.

2. Le amfetamine e i loro derivati

2.1 Amfetamina

La molecola di amfetamina contiene un centro chirale ed esiste in due enantiomeri: destroamfetamina (d-amfetamina) e levoamfetamina (l-amfetamina). Il termine “amfetamina” si riferisce propriamente alla miscela racemica costituita da parti uguali di d-amfetamina e l-amfetamina. Tuttavia, la maggior parte dei farmaci a base di amfetamina attualmente in uso contiene prevalentemente o esclusivamente l’isomero d, poiché questo risulta più potente e clinicamente più efficace rispetto all’isomero l. Un esempio è rappresentato dalla destroamfetamina, che non contiene l’isomero l [1].

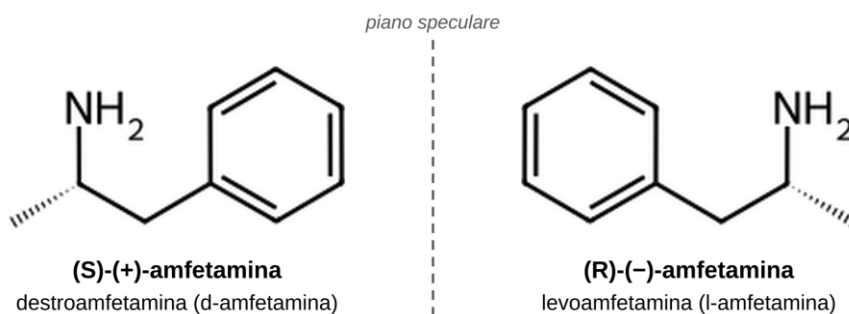


Figura 1: Strutture chimiche degli enantiomeri dell’amfetamina: (S)-(+)-amfetamina (destroamfetamina) e (R)-(-)-amfetamina (levoamfetamina) [1].

L'amfetamina è una sostanza farmacologicamente attiva utilizzata, in specifiche formulazioni, nella gestione e nel trattamento del disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD) e della narcolessia. È classificata come stimolante del sistema nervoso centrale. In particolare, le amfetamine sono ammine simpaticomimetiche ad azione indiretta e presentano un potenziale di abuso. Dosi elevate di amfetamine possono essere associate a danno epatico e a forme di epatotossicità clinicamente evidenti, più comunemente associate alla 3,4-metilendiossimetamfetamina (MDMA, “ecstasy”) [2].

2.1.1 Epidemiologia ed eziologia

Secondo i dati più recenti dell’*European Union Drugs Agency* (EUDA), le indagini condotte in 26 Stati membri dell’Unione Europea tra il 2018 e il 2024 stimano che circa 1,4 milioni di giovani adulti di età compresa tra 15 e 34 anni abbiano fatto uso di amfetamine nell’ultimo anno, corrispondenti all’1,4% della popolazione di questa fascia d’età. In questo contesto, il termine “amfetamine” comprende sia l’amfetamina sia la

metamfetamina [3]. Tra gli studenti di 15–16 anni, i dati dell'indagine ESPAD 2024 indicano una prevalenza dell'1,8% per l'uso di amfetamina almeno una volta nella vita e dell'1,4% per la metamfetamina [4].

L'uso di amfetamine è finalizzato alla ricerca di effetti quali euforia, aumento dell'energia e della vigilanza e, in alcuni casi, soppressione dell'appetito. Secondo i dati più recenti, tra le principali motivazioni riportate dagli utilizzatori di amfetamina figurano il desiderio di ottenere effetti euforizzanti o ricreativi, e la necessità di rimanere svegli. La dipendenza da amfetamine è associata, tra gli altri fattori, allo sviluppo di tolleranza agli effetti della sostanza, che può determinare la necessità di assumere dosi maggiori per ottenere effetti comparabili [5, 6].

2.1.2 Farmacocinetica

L'amfetamina è disponibile in diverse forme per somministrazione orale, tra cui capsule, compresse, soluzioni orali e formulazioni a rilascio prolungato e a lunga durata d'azione, con dosaggi variabili da 2,5 a 54 mg [2]. L'amfetamina presenta una biodisponibilità orale di circa il 75% e raggiunge le concentrazioni plasmatiche massime circa 3 ore dopo l'ingestione [7]. Dopo l'assorbimento, l'amfetamina viene ampiamente distribuita nell'organismo e, grazie alle sue caratteristiche chimico-fisiche, attraversa la barriera emato-encefalica raggiungendo il sistema nervoso centrale, dove esercita i propri effetti farmacologici. L'amfetamina viene metabolizzata principalmente a livello epatico da diversi enzimi, tra cui il citocromo CYP2D6, la dopamina β -idrossilasi e la monoossigenasi-3 contenente flavina [8]. Una quota compresa tra il 30 e il 40% dell'amfetamina viene eliminata come farmaco immodificato nelle urine. Il pH urinario influenza significativamente l'eliminazione dell'amfetamina: un ambiente urinario acido ne favorisce l'escrezione renale, mentre l'alcalinizzazione delle urine ne riduce la *clearance* e ne prolunga l'emivita di eliminazione [9].

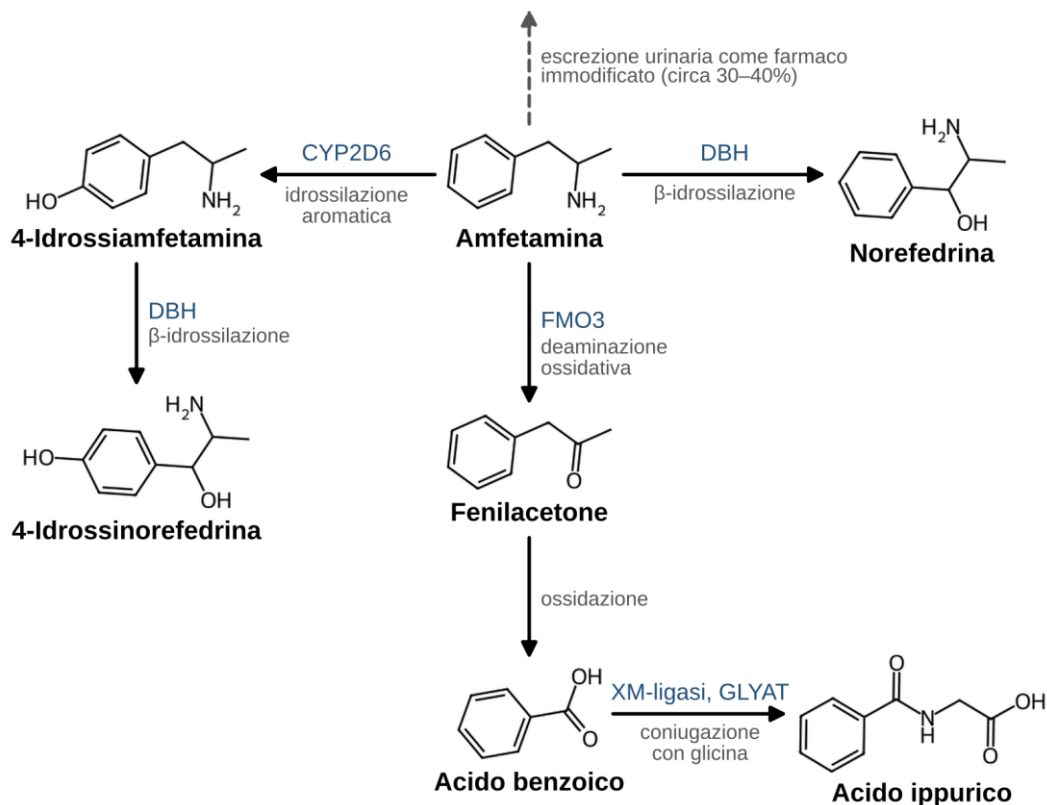


Figura 2: Principali vie metaboliche dell'amfetamina (CYP2D6: citocromo P450 2D6; DBH: dopamina β-idrossilasi; FMO3: monoossigenasi 3 contenente flavina). Adattato da [8, 10].

2.1.3 Farmacodinamica ed epatotossicità

L'amfetamina è un potente stimolante del sistema nervoso centrale (SNC) che agisce aumentando i livelli di dopamina, noradrenalina e, in misura minore, serotonina nella fessura sinaptica attraverso diversi meccanismi [11, 12]. L'amfetamina raggiunge il terminale assonale presinaptico sia per diffusione attraverso la membrana cellulare sia mediante il trasporto mediato dai trasportatori di monoamine DAT, NET e SERT. Una volta all'interno del terminale presinaptico, l'amfetamina aumenta i livelli di neurotrasmettitori monoaminici nel citosol attraverso l'alterazione della funzione del trasportatore vescicolare delle monoamine 2 (VMAT 2) e dei gradienti elettrochimici necessari per il trasportatore vescicolare [11]. L'amfetamina inibisce inoltre il metabolismo dei neurotrasmettitori monoaminici attraverso l'inibizione delle monoamino ossidasi (MAO). Allo stesso tempo, stimola il recettore intracellulare TAAR1, che induce l'internalizzazione e l'inversione della funzione del trasportatore della dopamina (DAT) [12]. Gli effetti mediati da TAAR1 sul DAT possono interessare anche i trasportatori della noradrenalina (NET) e della serotonina (SERT). Il risultato di questa attività è un aumento dell'efflusso di dopamina nella fessura sinaptica e una riduzione della sua

ricaptazione dovuta all'internalizzazione del DAT e alla competizione diretta con il neurotrasmettitore [13].

Diverse amfetamine sono state associate a casi clinicamente evidenti e talvolta fatali di danno epatico acuto. Questi casi si verificano tipicamente in seguito all'uso endovenoso, in particolare dopo somministrazione di una singola dose eccessiva. Tra le sostanze appartenenti a questa classe, la 3,4-metilendiossimetamfetamina (MDMA, comunemente nota come "*ecstasy*") è stata implicata nel maggior numero di casi, molti dei quali gravi e che hanno portato ad insufficienza epatica acuta e morte [2].

Il meccanismo eziopatogenetico della tossicità epatica associata alle amfetamine non è ancora completamente chiarito. Tuttavia, poiché tali molecole sono sottoposte a metabolismo epatico mediato dal sistema del citocromo P450, in particolare dal CYP2D6, è stato ipotizzato che, soprattutto a dosi elevate, il danno epatico possa essere correlato alla formazione di metaboliti tossici [2].

2.1.4 Utilizzo dell'amfetamina nel trattamento del disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD)

Il disturbo da deficit di attenzione/iperattività (ADHD) è un disturbo del neurosviluppo a esordio generalmente infantile, caratterizzato da una sintomatologia basata su persistente disattenzione, iperattività e impulsività [14].

La terapia orale con amfetamine ha dimostrato di migliorare alcuni aspetti delle funzioni cognitive, del funzionamento psicologico e delle prestazioni in bambini e adulti con sospetto di disturbo da deficit di attenzione e iperattività. Le amfetamine possono inoltre determinare una riduzione dei sintomi di iperattività e impulsività nei bambini con ADHD e vengono utilizzate anche nel trattamento della narcolessia [2].

Il trattamento farmacologico dell'ADHD comprende farmaci stimolanti e non stimolanti. Tra gli stimolanti sono inclusi il metilfenidato (MPH) e la lisdexamfetamina dimesilato (LDX), quest'ultima un profarmaco della destroamfetamina [15]. Gli stimolanti sono ampiamente utilizzati nel trattamento farmacologico dell'ADHD, in considerazione della loro efficacia nel ridurre la sintomatologia rispetto ai farmaci non stimolanti [16, 17].

Sia il metilfenidato che le amfetamine agiscono bloccando i trasportatori presinaptici di dopamina (DA) e norepinefrina (NE), aumentando così la trasmissione delle

catecolamine; tuttavia, le amfetamine aumentano anche l'efflusso presinaptico di DA [16].

La destroamfetamina, citata in precedenza, appartiene ai farmaci amfetaminici approvati dalla FDA (*Food and Drug Administration*) per il trattamento dell'ADHD nei bambini di età inferiore ai sei anni [13]. Tuttavia, nelle linee guida dell'*American Academy of Pediatrics*, per i bambini in età prescolare, compresa tra 4 e 5 anni, la terapia comportamentale è raccomandata come trattamento di prima linea; il trattamento farmacologico può essere preso in considerazione nei casi in cui tale intervento non determini un miglioramento significativo e persista una compromissione funzionale di grado moderato o grave [18].

La destroamfetamina è disponibile sotto forma di compresse a rilascio immediato, capsule a rilascio prolungato e soluzione orale. I MAS (sali misti di amfetamina) sono disponibili come compresse a rilascio immediato o capsule a rilascio prolungato. Le formulazioni a rilascio immediato possono essere preferite inizialmente per stabilire una dose giornaliera ottimale, con conversione a una formulazione a rilascio prolungato in seguito. Le formulazioni a rilascio prolungato sono generalmente destinate alla somministrazione una volta al giorno, sebbene in alcuni casi possa essere necessario associare una formulazione a rilascio immediato per mantenere l'effetto clinico nel corso della giornata [19].

Il dosaggio delle amfetamine nel trattamento dell'ADHD varia in funzione della formulazione e della risposta individuale al trattamento. Per le formulazioni a rilascio immediato, il dosaggio può variare da 5 a 40 mg al giorno, generalmente suddiviso in una o più somministrazioni a intervalli di 4–6 ore. Dosi superiori a 40 mg al giorno risultano raramente più efficaci e, in alcune formulazioni e popolazioni di pazienti, la dose massima può raggiungere i 60 mg al giorno [13, 20].

2.1.5 Effetti avversi

L'associazione tra l'utilizzo di amfetamina e il rischio di eventi cardiovascolari gravi è stata oggetto di discussione [13]. Sono stati segnalati eventi cardiovascolari gravi come infarto miocardico e morte cardiaca improvvisa in pazienti, compresi i bambini, trattati con farmaci stimolanti. L'uso di amfetamine in concomitanza con altri agenti serotoninergici e/o inibitori del CYP2D6, tra cui fluoxetina, paroxetina e bupropione, può aumentare il rischio di sindrome serotoninergica [13, 21, 22]. Nei pazienti che assumono

questi farmaci, la somministrazione di amfetamine deve essere iniziata con cautela, con un attento monitoraggio della comparsa di segni e sintomi di sindrome serotoninergica.

Tra gli effetti avversi più comuni associati al trattamento con amfetamine sono stati riportati insonnia, cefalea, secchezza delle fauci, tachicardia, aumento della pressione arteriosa sistolica, irrequietezza e irritabilità [13].

2.1.6 Strategie di intervento nell'intossicazione acuta da amfetamine

Il trattamento dell'intossicazione acuta da amfetamine è principalmente di supporto, poiché non sono disponibili antidoti specifici. La gestione è pertanto finalizzata al controllo dei sintomi e alla prevenzione e al trattamento delle eventuali complicanze. In presenza di convulsioni, le benzodiazepine rappresentano il trattamento di prima scelta e possono essere somministrate per via parenterale. Il diazepam può essere somministrato per via endovenosa quando è disponibile un accesso venoso; in alternativa, possono essere utilizzati lorazepam o midazolam, anche per via intramuscolare. Nei casi di convulsioni persistenti o refrattarie, possono essere presi in considerazione ulteriori farmaci anticonvulsivanti, tra cui fenobarbital o propofol, in funzione della gravità del quadro clinico [6].

I pazienti che presentano *delirium* possono trarre beneficio da un trattamento aggiuntivo con un antagonista dopaminergico, come l'aloiperidolo. Tuttavia, sebbene il blocco della dopamina possa aiutare a trattare i disturbi psichiatrici e psicomotori associati alla tossicità da amfetamine, l'impiego di questi farmaci deve essere valutato con cautela. Gli antagonisti dopaminergici possono infatti ridurre la soglia convulsiva, causare effetti extrapiramidali, aumentare la produzione di calore alterando la funzione termoregolatrice, e prolungare l'intervallo QTc [23–26]. Pertanto, il loro utilizzo nel contesto dell'intossicazione da amfetamine deve essere attentamente valutato in relazione al quadro clinico del paziente.

L'ipertensione associata alla tossicità da amfetamine può attenuarsi con il trattamento dell'agitazione. Tuttavia, alcuni pazienti potrebbero necessitare di un trattamento antipertensivo per contrastare l'urgenza o l'emergenza ipertensiva. I vasodilatatori periferici, come la nitroglicerina e la nicardipina, possono essere utilizzati per il controllo della pressione arteriosa. L'impiego dei β -bloccanti come unica terapia antipertensiva deve essere valutato con cautela, poiché il blocco dei recettori β -adrenergici in presenza

di una marcata attività α -adrenergica è stato associato al rischio di peggioramento della vasocostrizione e dell'ipertensione. Analogamente, l'ipertermia può attenuarsi con il controllo dell'agitazione e dell'attività muscolare. Nei casi più gravi può essere necessario ricorrere a misure di raffreddamento rapido, mediante tecniche di raffreddamento esterno e, quando indicato, somministrazione di fluidi per via endovenosa. Le terapie di raffreddamento esterno devono essere somministrate rapidamente quando i pazienti presentano temperature superiori a 42 °C [6].

La consultazione con uno specialista in dipendenze, la terapia cognitivo-comportamentale e la terapia di gruppo rimangono i mezzi principali per trattare il disturbo da uso di amfetamine [6, 27, 28].

2.2 Metamfetamina

La metamfetamina (N-metil-1-fenilpropan-2-ammina) è il derivato N-metilico dell'amfetamina; il suo isomero ottico biologicamente più attivo è la S-metamfetamina (d-metamfetamina) [10, 29]. Il cloridrato di S-metamfetamina si presenta sotto forma di cristalli bianchi o traslucidi e viene comunemente chiamato “ice” o “*crystal meth*” [30]. La metamfetamina in polvere presenta generalmente una purezza di circa il 10%, mentre la purezza della “base”, una forma oleosa e umida, raggiunge una purezza media del 20% [31, 32]. La forma cristallina, invece, è adatta per l'inalazione di vapori poiché il cloridrato di S-metamfetamina ad elevata purezza vaporizza senza andare incontro a pirolisi [33, 34]. Rispetto alle preparazioni a minore purezza, la metamfetamina cristallina è associata ad una maggiore incidenza di dipendenza [35].

La metamfetamina (METH) è uno psicostimolante illecito ampiamente utilizzato a livello mondiale. Diverse evidenze suggeriscono che l'abuso cronico di METH induca alterazioni neurodegenerative nel cervello umano, tra cui danni agli assoni dopaminergici e serotoninergici, perdita di materia grigia accompagnata da ipertrofia della materia bianca e microglia in differenti aree cerebrali [36].

La METH è uno psicostimolante con un elevato potenziale di dipendenza, che determina sensazioni di allerta, aumento di energia ed euforia [5, 37]. Il composto fu sintetizzato per la prima volta a partire dall'efedrina nel 1893 dal chimico giapponese Nagai Nagayoshi. Nel 1919, Akira Ogata sintetizzò la forma cristallina della METH mediante riduzione dell'efedrina con fosforo rosso e iodio, ponendo le basi per la produzione della droga su

più larga scala. Ancora oggi, negli Stati Uniti, la METH per via orale viene impiegata come trattamento di seconda linea per diverse condizioni mediche, tra cui il disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD) e l'obesità refrattaria [38].

2.2.1 Epidemiologia dell'abuso di metamfetamina

La metamfetamina rappresenta una delle principali sostanze appartenenti alla classe degli stimolanti di tipo amfetaminico (*amphetamine-type stimulants*, ATS) e costituisce una delle droghe sintetiche illecite maggiormente diffuse a livello globale. Negli ultimi anni il mercato della metamfetamina ha registrato una marcata espansione, sostenuta dall'aumento della produzione clandestina, dall'evoluzione delle tecniche di sintesi e dalla crescente disponibilità di precursori chimici. Secondo il *World Drug Report 2026* dell'*United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), i sequestri globali di ATS hanno raggiunto livelli record nel 2024 e risultano costituiti prevalentemente da metamfetamina, confermando il continuo incremento della produzione e del traffico internazionale di questa sostanza [39].

La diffusione della metamfetamina presenta un'importante variabilità geografica. L'Asia orientale e il Sud-est asiatico continuano a rappresentare il principale mercato mondiale della sostanza, concentrando circa il 55% dei consumatori globali di amfetamine e metamfetamina. Inoltre, tali regioni registrano il maggior numero di persone che accedono ai servizi di trattamento per disturbo da uso di ATS, indicando l'elevato impatto sanitario associato al consumo di queste sostanze [40].

Anche il Nord America continua a rappresentare una delle aree maggiormente interessate dal consumo e dal traffico di metamfetamina. Negli Stati Uniti, gran parte della sostanza sequestrata proviene dal Messico, dove operano organizzazioni criminali coinvolte nella produzione su scala industriale e nell'esportazione di metamfetamina cristallina ad elevata purezza (*crystal meth*). Parallelamente, la produzione clandestina si è progressivamente estesa oltre le tradizionali aree geografiche, interessando anche il Medio Oriente, l'Africa e alcune regioni europee, a testimonianza della crescente globalizzazione del mercato degli stimolanti sintetici [39].

Negli ultimi anni è inoltre cambiato il profilo epidemiologico dei consumatori. Se in passato l'uso di metamfetamina era prevalentemente associato a specifici contesti occupazionali o a gruppi sociali ristretti, oggi interessa una popolazione molto più

eterogenea per età, livello socioeconomico e contesto culturale. Tale evoluzione, unita alla maggiore disponibilità della sostanza e all'elevata purezza delle preparazioni attualmente in commercio, contribuisce all'aumento dei casi di dipendenza, delle complicanze psichiatriche e degli accessi ai servizi sanitari correlati all'abuso di metamfetamina [39].

2.2.2 Meccanismo d'azione molecolare

La metamfetamina è un agonista indiretto del sistema monoaminergico, aumentando la disponibilità sinaptica di dopamina, noradrenalina e serotonina. La metamfetamina si va a sostituire alle monoamine a livello dei trasportatori di membrana (quali il trasportatore della dopamina DAT, della noradrenalina NET, della serotonina SERT ed il trasportatore vescicolare delle monoamine 2 (VMAT-2) sfruttando la somiglianza strutturale con i neurotrasmettitori endogeni. Il VMAT-2 è incorporato nelle membrane vescicolari, mentre il DAT, il NET ed il SERT sono proteine integrali della membrana della superficie cellulare [29].

Una volta penetrata nella terminazione nervosa, la metamfetamina agisce a livello delle vescicole di stoccaggio, invertendo la funzione del VMAT-2 ed alterando il gradiente di pH in modo tale da ridistribuire le monoamine dalle vescicole nel citosol. Anche la funzione endogena dei trasportatori della dopamina, della noradrenalina e della serotonina viene invertita, con il conseguente rilascio di queste sostanze dal citosol nelle sinapsi [10, 29]. Dunque, le monoamine sinaptiche sono disponibili per lo stimolo dei recettori monoaminergici post-sinaptici.

Oltre a promuovere il rilascio delle monoamine, la metamfetamina può contribuire ad aumentarne la disponibilità sinaptica attraverso una modesta inibizione dell'attività delle monoamino ossidasi (MAO), gli enzimi deputati al loro metabolismo, sebbene tale meccanismo rivesta un ruolo secondario rispetto all'azione sui trasportatori monoaminergici [29].

2.2.3 Farmacocinetica

La metamfetamina può essere assunta per via orale, endovenosa, intranasale o per inalazione (fumata), con biodisponibilità e velocità d'insorgenza degli effetti che variano sensibilmente in base alla via di somministrazione. Una volta in circolo, la sostanza si

distribuisce ampiamente nell'organismo grazie alla sua elevata lipofilia. Nello specifico, l'*uptake* più elevato in termini di organo si osserva a livello polmonare (22% della dose) ed epatico (23%), con un accumulo intermedio nel cervello (10%); anche i reni mostrano un elevato *uptake* per unità di volume (7%). Anche i tempi di *clearance* sono molto diversi tra i vari distretti corporei, con eliminazione più rapida a livello cardiaco e polmonare rispetto a cervello, fegato e stomaco [41].

Il metabolismo avviene principalmente per via epatica ed è mediato principalmente dall'isoenzima CYP2D6 del sistema del citocromo P450 [42]. La metamfetamina viene metabolizzata ad amfetamina, un metabolita farmacologicamente attivo, e ad altri metaboliti, tra cui p-idrossi-amfetamina e norefedrina, caratterizzati da un'attività farmacologica significativamente inferiore rispetto al composto parentale. L'emivita di eliminazione della metamfetamina è relativamente lunga e varia generalmente tra 6 e 15 ore, in funzione delle caratteristiche individuali e delle condizioni fisiologiche del soggetto [10].

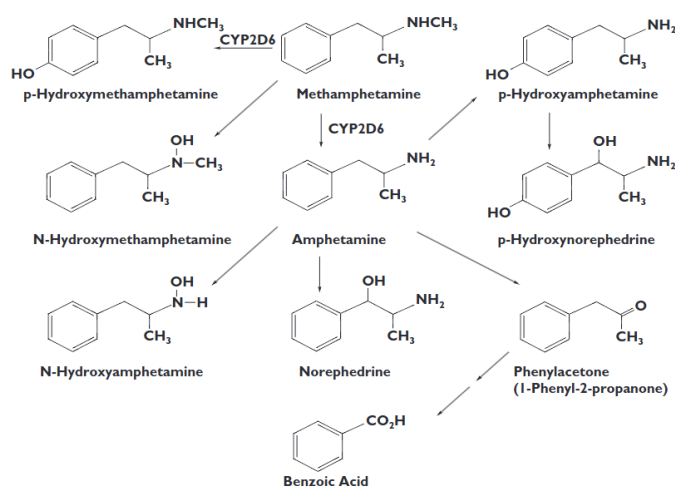


Figura 3: Principali vie metaboliche della metamfetamina. Tratta da [42].

Un aspetto peculiare della farmacocinetica della metamfetamina è rappresentato dalla marcata influenza del pH urinario sull'eliminazione renale. L'alcalinizzazione delle urine riduce l'escrezione della sostanza aumentando il riassorbimento tubulare e determinando un prolungamento dell'emivita e dell'esposizione sistemica. Al contrario, l'acidificazione urinaria favorisce la ionizzazione della metamfetamina, accelerandone l'eliminazione attraverso le urine [2, 10].

2.2.4 Farmacodinamica

Il trattamento con METH determina un rapido aumento del rilascio sia di dopamina (DA) che di serotonina (5-HT) nello spazio sinaptico [43]. L'incremento delle concentrazioni extracellulari di dopamina induce inoltre un aumento del rilascio di glutammato, contribuendo agli effetti eccitotossici della sostanza [44]. La METH può provocare anche danni a lungo termine a livello delle terminazioni assonali dopaminergiche e serotoninergiche nello striato, nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale [45]. Tra i principali marcatori neurochimici della neurotossicità indotta dalla METH vi sono la riduzione dell'espressione della tirosina idrossilasi e della triptofano idrossilasi, ossia enzimi che limitano la velocità di sintesi rispettivamente della dopamina e della serotonina. Tali alterazioni determinano una ridotta sintesi dei due neurotrasmettitori e si associano inoltre a una diminuzione dell'espressione dei rispettivi trasportatori presinaptici, DAT e SERT [43].

È stato inoltre riscontrato un coinvolgimento dei nuclei catecolaminergici della formazione reticolare del tronco encefalico: la neurotossicità della METH deriva proprio dalla sua selettività molecolare ed anatomica per questi neuroni. Di conseguenza, sia l'assunzione acuta sia quella cronica possono determinare alterazioni comportamentali, motorie e vegetative, la cui espressione dipende da una specifica rete di nuclei reticolari spesso sovrapposti tra loro [46, 47].

L'uso cronico di METH è spesso associato a deficit cognitivi che spaziano dalla compromissione del controllo degli impulsi a problemi di attenzione, memoria, processi decisionali e coordinazione motoria [48, 49]. Tra le conseguenze dell'abuso a lungo termine di METH ritroviamo una perdita parziale ma persistente dei sistemi di DA e 5-HT in molteplici aree cerebrali, come lo striato, la corteccia e l'ippocampo: queste potrebbero essere le ragioni della tossicità parziale delle monoamine indotta dalla METH. Inoltre, numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato che i consumatori cronici di METH presentano un rischio maggiore di sviluppare la malattia di Parkinson (PD) rispetto ai non consumatori [50, 51].

Nei consumatori cronici di METH sono stati osservati segni di microgliosi e astrogliosi, indicativi di una persistente risposta neuroinfiammatoria. La gliosi rappresenta un naturale processo reattivo delle cellule gliali, in particolare astrociti e microglia, che si

attiva in risposta a lesioni, danni, infezioni o alterazioni dell'omeostasi cerebrale. Essa è caratterizzata in parte da una maggiore espressione di proteine specifiche della glia, corpi cellulari e processi morfologicamente ipertrofici e, in alcuni casi, anche da proliferazione e migrazione cellulare [52].

La METH induce anche danni al DNA e alterazioni nell'espressione dei geni correlati a Bcl-2, i quali possono contribuire alla morte cellulare degli interneuroni GABAergici [53, 54]. Nel corso degli anni sono stati proposti numerosi meccanismi molecolari per spiegare le proprietà neurotossiche della METH, tra cui lo stress ossidativo e l'apoptosi nelle linee cellulari dopaminergiche [55,56]. Recentemente, un numero crescente di studi ha evidenziato il coinvolgimento dell'autofagia, un processo fisiologico di degradazione intracellulare mediato dai lisosomi, nel danno cellulare indotto dalla METH [37].

2.2.5 Effetti avversi

L'intossicazione acuta da metamfetamina si manifesta tipicamente con agitazione, midriasi, tachicardia, ipertensione e tachipnea; nei casi più gravi possono comparire iperpiressia, insufficienza cardiaca, epatica o renale, rabdomiolisi e, più raramente, convulsioni o coma. I decessi correlati derivano soprattutto da complicanze cardiovascolari acute (edema polmonare, emorragia cerebrovascolare, fibrillazione ventricolare) o da comportamenti a rischio associati ad alterazioni psichiche indotte dalla sostanza [57, 58].

L'uso cronico di metamfetamina è associato a disturbi psichiatrici, tra cui episodi psicotici caratterizzati da sintomi paranoidei e allucinatori, che possono presentare caratteristiche cliniche simili a quelle osservate nella schizofrenia [59–61]. L'esposizione prolungata è inoltre associata a complicanze cardiovascolari, tra cui cardiomiopatia, malattia coronarica e aumento del rischio di eventi cerebrovascolari [10]. La sospensione dell'uso può determinare una sindrome da astinenza caratterizzata da alterazioni del sonno, umore depresso, *craving* e difficoltà cognitive [10].

Sul piano neurobiologico, l'esposizione ripetuta alla metamfetamina può determinare una neurotossicità selettiva a carico dei terminali assonali dopaminergici e serotoninergici. Tra i meccanismi proposti rientrano lo stress ossidativo, la formazione di specie reattive derivanti dal metabolismo delle monoamine e l'ipertermia associata all'assunzione della sostanza [62]. Il danno ai sistemi dopaminergici, documentabile *in vivo* attraverso una

riduzione della densità del DAT, è stato associato a deficit neuropsicologici che coinvolgono funzioni esecutive, memoria e attenzione e a un aumentato rischio di sviluppare la malattia di Parkinson nel lungo termine [50, 51]. Sono inoltre stati descritti effetti sulla funzione sessuale, possibili conseguenze dell'esposizione prenatale e complicanze a carico dell'apparato dentale e della cute, tra cui bruxismo e infezioni da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), anche in relazione ai comportamenti di *skin-picking* [63, 64].

2.2.6 Trattamento della neurotossicità

Attualmente non è disponibile un trattamento farmacologico specifico in grado di prevenire o invertire la neurotossicità indotta dalla metamfetamina [37]. Diversi approcci farmacologici sono stati tuttavia studiati in modelli sperimentali, con l'obiettivo di contrastare i principali meccanismi coinvolti nel danno neuronale, tra cui neuroinfiammazione, stress ossidativo, disfunzione mitocondriale e alterazioni dei sistemi dopaminergici. Tra le strategie maggiormente studiate rientrano l'impiego di minociclina, la modulazione della funzione della parkina e di specifiche citochine, nonché l'utilizzo della colecistochinina-8 [37].

La minociclina è una tetraciclina di seconda generazione in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e dotata di proprietà antinfiammatorie e neuroprotettive [65–69]. I suoi effetti neuroprotettivi sono stati studiati in diversi modelli animali di patologie neurologiche, tra cui sclerosi laterale amiotrofica, malattia di Huntington e malattia di Parkinson [70–73]. In uno studio di microdialisi *in vivo*, il pretrattamento con minociclina (40 mg/kg) ha attenuato significativamente l'aumento dei livelli extracellulari di dopamina nello striato indotto dalla somministrazione di METH (3 mg/kg) [74]. Gli effetti neuroprotettivi osservati sono stati messi in relazione alla modulazione della risposta microgliale e alla preservazione dell'integrità mitocondriale e del citocromo c [37].

La parkina, una ubiquitina-proteina ligasi E3, svolge un ruolo fondamentale nei processi di ubiquitinazione e degradazione proteica attraverso il proteasoma 26S [75–77]. Alterazioni della sua funzione nei neuroni dopaminergici sono state associate a processi neurodegenerativi [78, 79]. Al contrario, studi *in vitro* e *in vivo* hanno evidenziato un possibile effetto neuroprotettivo della sovraespressione di parkina nei confronti di diversi

meccanismi coinvolti nella neurotossicità indotta dalla METH, tra cui stress ossidativo, disfunzione mitocondriale e compromissione della funzione proteasomiale [80–82].

Anche alcune citochine sono state investigate come possibili modulatori della neurotossicità da METH [83]. In particolare, l'interferone- γ (IFN- γ) ha mostrato, in modelli sperimentali, la capacità di attenuare la neurotossicità indotta dalla METH e di modulare la risposta all'ipertermia associata alla sostanza [84].

Infine, la colecistochinina-8 (CCK-8), un peptide coinvolto nella modulazione di numerosi processi a livello del sistema nervoso centrale, è stata studiata per le sue proprietà antinfiammatorie e neuroprotettive. La CCK-8 modula il rilascio di diversi neurotrasmettitori, tra cui dopamina e GABA, e ha mostrato effetti neuroprotettivi in diversi modelli sperimentali di danno neuronale [85–87].

2.3 MDMA e MDA

La 3,4-metilendiossimetamfetamina (MDMA) è una fenetilamina sostituita appartenente alla classe delle amfetamine, sintetizzata per la prima volta nel 1912 dall'azienda farmaceutica tedesca Merck come intermedio del composto emostatico metilidrastitina [88]. L'MDMA viene utilizzata principalmente a scopo ricreativo ed è generalmente assunta come miscela dei suoi enantiomeri *R* ed *S* in rapporto 1:1. I suoi effetti includono un aumento della sensazione di energia, della socievolezza, dell'euforia e dell'empatia [89, 90].

L'MDMA agisce principalmente promuovendo il rilascio e inibendo la ricaptazione della serotonina (5-HT), della noradrenalina (NE) e della dopamina (DA). L'MDMA può inoltre inibire la monoamino ossidasi (MAO) e la triptofano idrossilasi (TPH) [91, 92]. Sono state inoltre descritte azioni dirette su diversi recettori, tra cui i recettori serotoninergici 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{2B}, il recettore muscarinico M₁, il recettore dell'istamina H₁, i recettori α - e β -adrenergici ed i recettori DA, nonché interazioni con i sistemi colinergico, glutammatergico e GABAergico [90, 93].

Inoltre, l'MDMA stimola il rilascio di ossitocina a livello ipotalamico, determinandone un aumento delle concentrazioni sia nel cervello sia nel circolo sanguigno. L'aumento del rilascio di ossitocina è stato associato agli effetti prosociali dell'MDMA, tra cui le sensazioni di connessione sociale ed empatia [94].

Nel complesso, gli effetti tipici dell'MDMA possono essere attribuiti prevalentemente all'attivazione dei sistemi 5-HT e NE [95].

Accanto all'MDMA, tra le amfetamine sostituite ad azione prevalentemente serotoninergica si colloca la 3,4-metilendiossiamfetamina (MDA), analogo N-demetilato dell'MDMA [96]. L'MDA è al tempo stesso una sostanza d'abuso a sé stante e il principale metabolita attivo dell'MDMA, generato per N-demetilazione epatica [91]. Di conseguenza, il riscontro analitico di MDA in un campione biologico può essere riconducibile sia ad un'assunzione diretta della sostanza sia al metabolismo di MDMA precedentemente assunta; pertanto, la sola positività qualitativa per MDA non consente di distinguere le due condizioni.

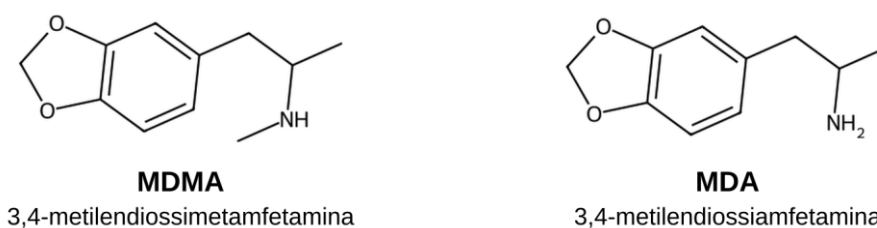


Figura 4: Strutture chimiche dell'MDMA (3,4-metilendiossimetamfetamina) e del suo metabolita N-demetilato MDA (3,4-metilendiossiamfetamina).

Dal punto di vista storico, l'MDA precede l'MDMA nell'impiego sia clinico sia ricreativo. Già alla fine degli anni '60, l'MDA fu oggetto di interesse nell'ambito della psicoterapia, precedendo il successivo interesse clinico rivolto all'MDMA [97]. Dal punto di vista degli effetti, l'MDA condivide con l'MDMA il profilo entactogeno, con proprietà stimolanti e una componente psichedelica più marcata [96].

2.3.1 Epidemiologia dell'MDMA e dell'MDA

L'MDMA rappresenta una delle sostanze psicoattive sintetiche maggiormente utilizzate in Europa, con un consumo generalmente associato alla vita notturna e all'intrattenimento [98]. Secondo i dati più recenti dell'*European Union Drugs Agency* (EUDA), circa 2,4 milioni di giovani adulti di età compresa tra 15 e 34 anni hanno utilizzato MDMA nell'ultimo anno, corrispondenti al 2,4% della popolazione di questa fascia d'età. Tra i giovani di 15–24 anni, la prevalenza stimata è pari al 2,1% [3].

Nel 2024, gli Stati membri dell'Unione Europea hanno segnalato circa 24.000 sequestri di MDMA, per un totale di 10,7 milioni di compresse e 4,2 tonnellate di sostanza in polvere [3].

I dati epidemiologici specifici relativi all'MDA sono invece più limitati rispetto a quelli disponibili per l'MDMA. Ciò è rilevante anche dal punto di vista tossicologico, poiché l'MDA può essere assunta direttamente oppure derivare dal metabolismo dell'MDMA; pertanto, il suo riscontro in un campione biologico deve essere interpretato considerando entrambe le possibili fonti di esposizione.

2.3.2 Origine e primi impieghi dell'MDMA

Alla fine degli anni '60, in seguito alla crescente restrizione dell'uso dell'acido lisergico dietilammide (LSD), alcuni terapeuti che utilizzavano sostanze psichedeliche iniziarono a esplorare altre sostanze come strumenti di supporto alla psicoterapia. Tra questi vi fu Leo Zeff, che conobbe l'MDMA nel 1976 grazie al chimico e ricercatore di sostanze psichedeliche Alexander "Sasha" Shulgin [99]. Zeff iniziò quindi a utilizzare l'MDMA nel contesto della psicoterapia, somministrandola a numerosi pazienti in un periodo in cui la sostanza non era ancora soggetta alle attuali restrizioni normative [100].

L'MDMA è classificata come sostanza entactogena [101]. Rispetto all'LSD, presenta una durata d'azione generalmente più breve e un profilo di effetti caratterizzato da un aumento delle sensazioni di empatia, vicinanza e connessione interpersonale [102].

Tra gli anni '80 e '90, l'MDMA divenne ampiamente conosciuta con il nome gergale di "Ecstasy" e il suo utilizzo al di fuori dell'ambito clinico si diffuse, in particolare tra la popolazione giovanile. Nel 1984, in risposta al crescente numero di sequestri della sostanza, la *Drug Enforcement Administration* (DEA) annunciò l'intenzione di vietarne l'uso; nel maggio 1985 l'MDMA fu inserita nella *Schedule I* delle sostanze controllate negli Stati Uniti, con una conseguente significativa limitazione delle possibilità di ricerca sulla sostanza [103].

A metà degli anni '80 furono pubblicati diversi studi di caso non controllati, condotti prima dell'introduzione del divieto, nei quali veniva descritto l'impiego dell'MDMA nel trattamento di individui, coppie e gruppi [104, 105]. Nel 1988 la *Società Medica Svizzera di Terapia Psicolitica* condusse sedute di psicoterapia individuale e di gruppo con

MDMA e LSD. Oltre 100 pazienti con una vasta gamma di problemi psichiatrici ricevettero sedute terapeutiche grazie alle quali oltre il 90% descrisse miglioramenti a 19 mesi di *follow-up* [106]. Nel 1993, tuttavia, il Ministero della Salute svizzero ritirò l'autorizzazione alla prescrizione di MDMA e LSD da parte degli psichiatri svizzeri, anche in considerazione delle limitazioni metodologiche degli studi disponibili e in seguito alla morte di un paziente associata all'assunzione di ibogaina [107].

2.3.3 Farmacocinetica

L'MDMA viene assorbita rapidamente dopo somministrazione orale, raggiungendo le concentrazioni plasmatiche massime generalmente entro alcune ore dall'assunzione. La sostanza presenta un'elevata distribuzione nell'organismo e attraversa la barriera emato-encefalica, raggiungendo il sistema nervoso centrale, dove esercita i propri effetti farmacologici [108].

A seguito dell'assorbimento, l'MDMA viene ampiamente metabolizzata a livello epatico attraverso diverse vie metaboliche, principalmente mediate dal sistema del citocromo P450. Tra le principali vie di biotrasformazione rientrano la N-demetilazione, che porta alla formazione di MDA, e la trasformazione del gruppo metilendiossi [91, 109]. Tra i principali metaboliti dell'MDMA sono stati identificati MDA, 3,4-diidrossimetamfetamina (HHMA), 3,4-diidrossiamfetamina (HHA), 4-idrossi-3-metossimetamfetamina (HMMA) e 4-idrossi-3-metossiamfetamina (HMA). Tra questi, l'HMMA rappresenta il principale metabolita circolante nell'uomo e viene prevalentemente eliminato sotto forma di coniugato con acido glucuronico [109].

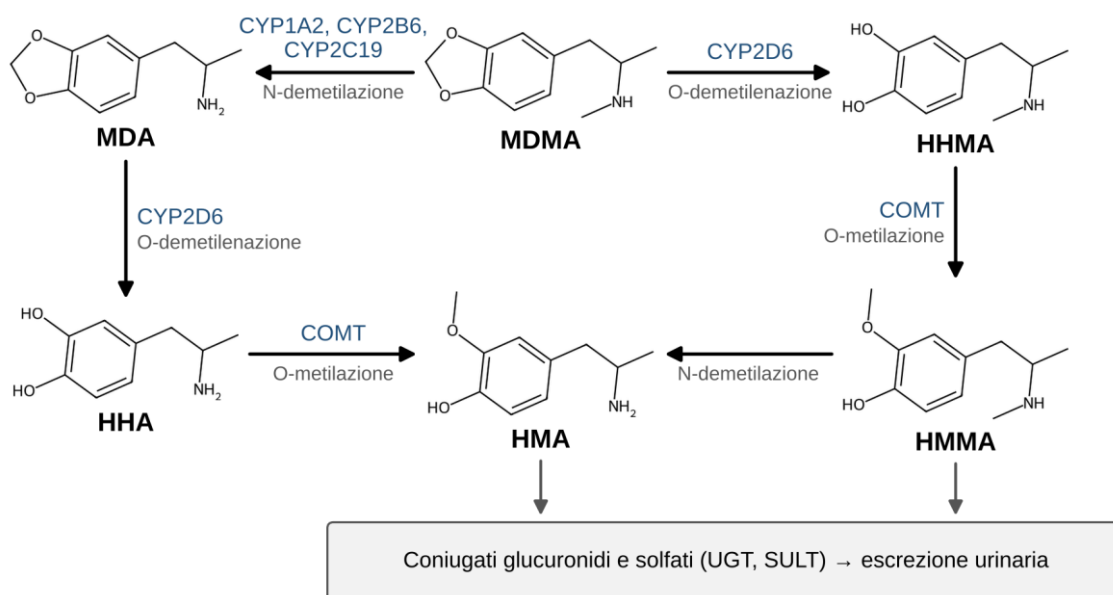


Figura 5: Principali vie metaboliche di MDMA e MDA nell'uomo (COMT: catecol-O-metiltransferasi; UGT: UDP-glucuronosiltransferasi; SULT: sulfotransferasi). Adattato da [91, 109].

Diversi enzimi del sistema del citocromo P450 partecipano al metabolismo dell'MDMA, tra cui CYP2C19, CYP2B6 e CYP1A2. La variabilità genetica degli enzimi coinvolti nel metabolismo può contribuire alle differenze interindividuali nell'esposizione sistemica all'MDMA e ai suoi metaboliti. In particolare, varianti genetiche associate a una ridotta attività di CYP2C19 o CYP2B6 determinano un aumento del rapporto MDMA/MDA, senza modificare significativamente le concentrazioni di HMMA [110, 111].

La ridotta attività di CYP2C19 è stata inoltre associata a una maggiore risposta cardiovascolare e a un'insorgenza più rapida degli effetti dopo la somministrazione di MDMA. Al contrario, le varianti a ridotta funzione di CYP2B6 sembrano influenzare prevalentemente il metabolismo nelle fasi più tardive, circa 3–4 ore dopo l'assunzione, suggerendo un ruolo secondario di questo enzima nella biotrasformazione dell'MDMA [110, 111].

L'MDMA presenta una farmacocinetica non lineare nell'uomo: all'aumentare della dose, le concentrazioni plasmatiche possono aumentare in misura sproporzionata rispetto alla dose somministrata. Tale comportamento è stato attribuito, almeno in parte, all'inibizione degli enzimi metabolici da parte dell'MDMA e dei suoi metaboliti. Dopo la somministrazione di una dose di 100 mg, l'emivita di eliminazione dell'MDMA è di circa 8–9 ore [112]. Anche gli enantiomeri presentano differenze nella farmacocinetica, con una maggiore emivita riportata per l'enantiomero *R* rispetto all'enantiomero *S* [112].

Per quanto riguarda l'MDA, la sua formazione a partire dall'MDMA avviene attraverso la *N*-demetilazione, rappresentando una via metabolica quantitativamente minoritaria [91]. L'MDA viene successivamente sottoposta a ulteriori reazioni metaboliche, tra cui O-demetilazione, O-metilazione e coniugazione [113]. La formazione dell'MDA presenta inoltre una componente stereoselettiva: mentre per l'MDMA si osservano concentrazioni plasmatiche generalmente superiori dell'enantiomero *R*, per l'MDA i parametri farmacocinetici C_{max} e AUC risultano maggiori per l'enantiomero *S* [113].

Gli studi di somministrazione controllata nell'uomo hanno evidenziato che, dopo assunzione di MDMA, l'MDA compare nel plasma più lentamente e a concentrazioni nettamente inferiori rispetto alla molecola madre e all'HMMA, secondo il rapporto generale MDMA > HMMA > MDA > HMA [114]. Questo aspetto risulta particolarmente rilevante nell'interpretazione dei risultati ottenuti da matrici biologiche caratterizzate da piccoli volumi di campione, come i *Dried Blood Spots*.

2.3.4 Farmacodinamica

L'MDMA esercita i propri effetti farmacologici principalmente attraverso l'aumento dei livelli extracellulari delle monoamine serotonina (5-HT), dopamina (DA) e noradrenalina (NE), con un'azione quantitativamente più rilevante sul sistema serotoninergico [115, 116]. La molecola interagisce con i trasportatori di membrana della serotonina (SERT), della dopamina (DAT) e della noradrenalina (NET), dei quali costituisce un substrato. Dopo essere stata trasportata all'interno del terminale presinaptico, l'MDMA determina sia l'inibizione della ricaptazione sia l'inversione del trasporto, favorendo l'efflusso delle monoamine dallo spazio intracellulare a quello extracellulare [117, 118].

L'aumento della concentrazione citoplasmatica delle monoamine è favorito anche dall'azione dell'MDMA a livello delle vescicole sinaptiche. La molecola interagisce con il trasportatore vescicolare delle monoamine (VMAT), alterandone la funzione e favorendo la fuoriuscita dei neurotrasmettitori nel citoplasma. Inoltre, in virtù delle proprie caratteristiche di base debole, può attraversare le membrane vescicolari e alterare il gradiente di pH necessario al mantenimento delle elevate concentrazioni intravescicolari di monoamine [118, 119]. Le monoamine così mobilizzate possono quindi essere trasportate verso lo spazio extracellulare attraverso l'inversione del trasporto mediato da SERT, DAT e NET.

L'azione dell'MDMA non è limitata ai trasportatori delle monoamine. La sostanza interagisce infatti con diversi recettori serotonergici, adrenergici, istaminergici e muscarinici [90, 93, 120, 121]. È stata inoltre descritta un'interazione con il recettore serotonergico 5-HT_{2B}, il cui coinvolgimento è stato associato al rilascio di serotonina indotto dall'MDMA. A livello neuroendocrino, la somministrazione di MDMA determina inoltre un aumento dei livelli plasmatici di diversi ormoni, tra cui cortisolo, prolattina, deidroepiandrosterone (DHEA), vasopressina e ossitocina [122, 123].

L'aumento della trasmissione serotonergica, dopaminergica e noradrenergica contribuisce al complesso degli effetti farmacologici dell'MDMA. In particolare, l'attivazione del sistema serotonergico è stata associata agli effetti prosociali ed entactogeni della sostanza, mentre l'incremento della trasmissione dopaminergica e noradrenergica contribuisce agli effetti stimolanti [124–127]. Il rilascio di ossitocina è stato inoltre associato alle modificazioni della prosocialità, dell'empatia e della percezione di vicinanza interpersonale osservate dopo l'assunzione di MDMA [128, 129].

Il profilo farmacodinamico dell'MDA è in larga parte sovrapponibile a quello dell'MDMA, con un'azione caratterizzata dal rilascio di monoamine attraverso i trasportatori di membrana. Studi sperimentali hanno dimostrato che entrambi gli enantiomeri dell'MDA possono indurre il rilascio di serotonina e dopamina mediante un meccanismo carrier-mediato e calcio-indipendente, riconducibile al trasporto inverso attraverso i trasportatori di membrana [130]. Gli enantiomeri (+) hanno mostrato una maggiore potenza rispetto ai corrispondenti enantiomeri (–) nel favorire il rilascio di serotonina e dopamina, evidenziando una componente stereoselettiva dell'attività farmacologica. Complessivamente, l'MDA mostra una maggiore efficacia come agente di rilascio della serotonina rispetto alla dopamina, in accordo con il profilo prevalentemente serotonergico delle amfetamine sostituite [130].

2.3.5 Uso terapeutico dell'MDMA: PTSD e prospettive future

Accanto al suo profilo di sostanza d'abuso, l'MDMA ha mostrato risultati promettenti come coadiuvante della psicoterapia nel trattamento del disturbo post-traumatico da stress (PTSD), sebbene i meccanismi alla base dei potenziali effetti terapeutici non siano ancora completamente definiti [131, 132]. Tra i principali effetti soggettivi associati all'assunzione di MDMA sono stati descritti l'aumento della prosocialità, la riduzione

della percezione della minaccia e l'euforia [132]. La riduzione della risposta di paura e l'aumento della fiducia interpersonale sono stati proposti come possibili fattori in grado di facilitare l'interazione terapeutica, in particolare nei pazienti con PTSD resistente ai trattamenti convenzionali [133–140].

Sul piano delle prospettive future, la ricerca clinica ha già iniziato a esplorare applicazioni terapeutiche che vanno oltre il PTSD, come il trattamento dell'ansia associata ai disturbi dello spettro autistico e all'impiego della psicoterapia assistita da MDMA nel disturbo da uso di alcol [109, 131, 132].

2.3.6 Effetti collaterali

Analogamente ad altre amfetamine, l'MDMA può determinare una serie di effetti avversi, tra cui tachicardia, bruxismo, secchezza delle fauci, palpitazioni, sudorazione e insonnia [109]. Rabdomiolisi, aritmie cardiache, ipertermia, iponatriemia e insufficienza renale acuta rappresentano le complicanze più gravi e possono contribuire all'esito fatale in seguito ad intossicazione da MDMA [109]. Gli effetti avversi possono essere ulteriormente aggravati dall'intenso esercizio fisico e dall'ambiente caldo caratteristici dei *rave*.

Gli effetti dell'MDMA sulla funzione cardiaca sono rilevanti, con la noradrenalina che contribuisce in misura significativa agli effetti cardiostimolanti osservati dopo l'assunzione di MDMA [109, 121, 126, 141]. Oltre ad aumentare la pressione sanguigna sistolica, la sostanza può indurre aritmie cardiache e miocardite [109]. L'infarto miocardico può verificarsi anche in seguito all'assunzione di MDMA, sebbene sia riportato con una frequenza inferiore rispetto alla somministrazione di cocaina o amfetamine. A lungo termine, l'uso di MDMA può essere associato allo sviluppo di valvulopatie, potenzialmente correlate allo stress ossidativo o all'attivazione dei recettori 5-HT_{2B} da parte dell'MDMA [109].

Per quanto riguarda il potenziale di dipendenza dell'MDMA, i dati disponibili sono contrastanti. È stato ipotizzato che l'MDMA abbia un potenziale di abuso inferiore rispetto ad altre sostanze sulla base delle segnalazioni di consumatori a scopo ricreativo, che hanno riferito una riduzione degli effetti piacevoli con l'uso ripetuto, associata a un aumento degli effetti avversi. Nel complesso, l'MDMA sembra avere proprietà di rinforzo [109].

L'aspetto più controverso della farmacologia dell'MDMA riguarda il suo potenziale effetto neurotossico. Nei consumatori abituali di MDMA sono stati riscontrati livelli più bassi di acido 5-idrossiindolacetico (5-HIAA) nel liquido cerebrospinale, il principale metabolita della serotonina, dato che ha portato a ipotizzare un possibile coinvolgimento di una tossicità a carico del sistema serotoninergico [109]. È stato inoltre osservato che i consumatori di MDMA hanno maggiori probabilità di essere affetti da disturbi psichiatrici, tra cui depressione, disturbi psicotici, disturbi alimentari e disturbi d'ansia [109].

Il potenziale neurotossico documentato per l'MDMA è stato osservato anche per l'MDA. Mediante tecniche immunocitochimiche è stato dimostrato che la somministrazione sistemica di MDA e MDMA nel ratto determina, a distanza di due settimane, una marcata perdita di assoni serotoninergici in tutto il proencefalo, con completo risparmio degli assoni catecolaminergici [142]. Un elemento particolarmente significativo dal punto di vista neurobiologico è il carattere selettivo del danno: risultano infatti compromessi i terminali degli assoni serotoninergici, mentre i corpi cellulari dei nuclei del rafe e gli assoni di passaggio vengono preservati [142]. Si tratta dunque di un pattern di degenerazione assonale distale piuttosto che di una morte neuronale vera e propria, delineando una certa reversibilità del danno. Per quanto riguarda la tossicità acuta, l'MDA condivide con gli altri derivati amfetaminici un quadro sintomatologico caratterizzato da aumento della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca, midriasi, ansia e iperattività, con possibile evoluzione, nei casi più gravi, verso convulsioni, ipertermia e coma.

3. Matrice ematica

3.1 Il sangue: composizione e proprietà

Il sangue è un tessuto connettivo specializzato composto da elementi cellulari sospesi in una matrice fluida [143].

Il plasma è la componente fluida del sangue in cui sono sospesi eritrociti (globuli rossi), leucociti (globuli bianchi) e trombociti (piastrine). Il plasma si ottiene *in vitro* raccogliendo il sangue in presenza di un anticoagulante e successivamente centrifugandolo per separare la fase liquida dai componenti cellulari. Il plasma ha un aspetto giallo chiaro o paglierino, rappresenta circa il 55% del volume totale del sangue e costituisce la componente intravascolare del liquido extracellulare (LEC). È costituito prevalentemente da acqua (circa 90-92%) e contiene proteine (tra cui albumina, globuline e fibrinogeno), elettroliti, nutrienti, ormoni, gas disciolti e prodotti di scarto del metabolismo [143].

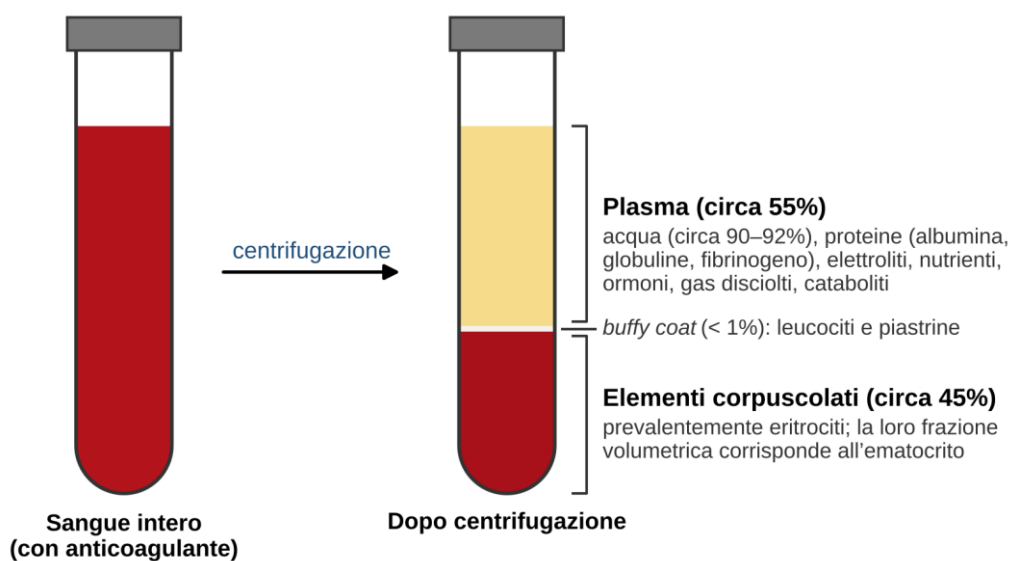


Figura 6: Composizione del sangue intero dopo centrifugazione. Adattato da [143].

Il siero è il fluido che rimane dopo la coagulazione del sangue. Il siero, a differenza del plasma, è privo di fibrinogeno e presenta una riduzione della maggior parte dei fattori della coagulazione, consumati durante la formazione del coagulo [143].

Il plasma svolge funzioni fisiologiche essenziali: trasporta nutrienti, ormoni, gas respiratori e cataboliti tra organi e tessuti; contribuisce al mantenimento dell'omeostasi regolando l'equilibrio idrico, il pH e la pressione osmotica e contribuisce alla

termoregolazione attraverso la distribuzione del calore. Le proteine plasmatiche, tra cui le immunoglobuline e le frazioni del complemento, sostengono le difese dell'organismo, mentre i fattori della coagulazione e il fibrinogeno consentono l'emostasi [143].

Di particolare rilievo per la tossicologia è la funzione di trasporto: il plasma rappresenta il principale veicolo di biomolecole, nutrienti, cataboliti, ormoni e farmaci. L'albumina lega e trasporta acidi grassi liberi, bilirubina, calcio e numerosi principi attivi; i chilomicroni e le lipoproteine a bassissima, bassa e alta densità (VLDL, LDL, HDL) trasportano i lipidi; la transtiretina e la globulina legante la tiroxina veicolano gli ormoni tiroidei [143].

3.1.1 La componente corpuscolata e l'ematocrito

Gli eritrociti, o globuli rossi, sono gli elementi cellulari del sangue specializzati nel trasporto dei gas respiratori e dei nutrienti nell'intero organismo. Il loro ruolo è centrale nello studio di numerosi processi patologici a carico dei diversi sistemi corporei [144].

L'eritrocita maturo ha una forma biconcava e discoidale ed è privo di nucleo. La sua struttura è delimitata da una membrana a doppio strato fosfolipidico, mantenuta da una rete di proteine che costituiscono il citoscheletro e dalle proteine di membrana ad esso collegate. Tra queste, spectrina, actina, proteina 4.1 e ankirina contribuiscono al mantenimento dell'integrità strutturale e della deformabilità della cellula, mentre la proteina banda 3 rappresenta una delle principali proteine integrali della membrana eritrocitaria. Le interazioni tra queste componenti conferiscono all'eritrocita una struttura resistente ma flessibile, caratteristica necessaria per il transito attraverso i capillari [144].

Ogni globulo rosso ha una durata di vita media di circa 120 giorni. In questo breve periodo, trasporta l'ossigeno dai polmoni ai tessuti periferici, dove viene utilizzato nei processi metabolici per la produzione di adenosina trifosfato (ATP), e raccoglie l'anidride carbonica prodotta a livello periferico, trasportandola ai polmoni per l'eliminazione dall'organismo. Nei polmoni, l'emoglobina contenente ferro in forma ferrosa (Fe^{2+}) lega l'ossigeno, mentre a livello dei tessuti la ridotta pressione parziale di ossigeno e il pH più basso ne favoriscono il rilascio. L'anidride carbonica viene in parte convertita all'interno dell'eritrocita in bicarbonato e ioni idrogeno mediante l'azione dell'anidrasi carbonica. La maggior parte dell'anidride carbonica viene quindi trasportata ai polmoni sotto forma

di bicarbonato, dove viene nuovamente convertita in anidride carbonica ed eliminata attraverso l'espiazione [144].

La frazione volumetrica occupata dagli elementi corpuscolati rispetto al volume ematico totale è definita ematocrito (HCT). Nel soggetto adulto sano, i valori si collocano orientativamente tra il 40% e il 52% nell'uomo e tra il 36% e il 48% nella donna, con variazioni fisiologiche legate a età, sesso, altitudine e stato di idratazione. Valori alterati possono essere osservati in condizioni patologiche, quali anemie, poliglobulie, disidratazione, nonché nei campioni prelevati *post mortem*.

3.1.2 Volume ematico e regolazione omeostatica

Il pH del sangue viene mantenuto entro un intervallo ristretto, compreso tra circa 7,35 e 7,45, valore essenziale per la normale funzione cellulare. Il sistema tampone del bicarbonato, costituito da acido carbonico e bicarbonato, è il principale tampone plasmatico e agisce in sinergia con la regolazione respiratoria e renale per mantenere l'omeostasi acido-base [143]. Tale parametro presenta inoltre implicazioni tossicologiche: ad esempio, per le amfetamine, che sono basi deboli, le variazioni del pH sistemico e urinario incidono in misura rilevante sulla distribuzione e sull'eliminazione renale del composto.

Con volume ematico si intende la quantità totale di sangue circolante in arterie, capillari, vene, venule e camere cardiache in un determinato momento. Il volume ematico è costituito da plasma ed elementi corpuscolati, rappresentati principalmente dagli eritrociti, mentre leucociti e piastrine ne costituiscono solo una frazione minima. Il plasma rappresenta circa il 60% del volume ematico totale, mentre gli eritrociti ne costituiscono circa il 40% insieme a leucociti e piastrine [145].

Il volume ematico è finemente regolato e correlato a molteplici sistemi d'organo ed è strettamente associato al contenuto di sodio e allo stato di idratazione. In condizioni fisiologiche, l'organismo mantiene un'osmolalità compresa tra 275 e 295 mOsm/Kg di acqua attraverso la regolazione dell'equilibrio di acqua e sodio, principalmente a livello renale [146]. Il volume ematico può aumentare o diminuire a causa di disfunzioni sistemiche e le sue variazioni possono portare a diverse condizioni cliniche, come shock ipovolemico o edema. Il mantenimento di un volume adeguato è necessario per garantire

la perfusione di tutti i tessuti, poiché pressoché tutte le cellule dell'organismo dipendono dal sangue per l'apporto di nutrienti e per l'eliminazione dei cataboliti.

3.2 Il sangue come matrice di elezione in tossicologia forense

3.2.1 Vantaggi

La matrice ematica è generalmente preferita alle altre matrici biologiche per la maggiore correlazione tra la presenza degli xenobiotici nel campione e gli effetti tossicologici osservati. I campioni di sangue consentono di rilevare gli xenobiotici e sostanze stupefacenti, offrono ampie possibilità di analisi, consentono un'interpretazione farmacologica più diretta degli effetti delle sostanze e forniscono informazioni relative a un'esposizione avvenuta nel recente passato, generalmente nell'arco di ore o giorni [147]. Per questa ragione, esso costituisce una matrice di riferimento nei procedimenti in cui occorre stabilire la recente assunzione di una sostanza e la sua eventuale relazione temporale con gli effetti osservati, come negli accertamenti relativi alla guida in stato di alterazione o alla valutazione della capacità di intendere e di volere.

3.2.2 Prelievo e gestione dei campioni ematici in ambito tossicologico-forense

In ambito tossicologico-forense, le modalità di raccolta e gestione dei campioni ematici rappresentano un aspetto rilevante ai fini della corretta interpretazione dei risultati analitici. Nei soggetti viventi, il sangue viene generalmente prelevato mediante venipuntura, utilizzando dispositivi e contenitori idonei alla successiva analisi tossicologica. La scelta dell'anticoagulante, il volume di campione raccolto, le condizioni di conservazione e il tempo intercorso tra il prelievo e l'analisi possono infatti influenzare la stabilità degli analiti e la qualità del risultato analitico.

Nel contesto *post-mortem*, il campionamento ematico presenta caratteristiche differenti rispetto al soggetto vivente [148]. La sede di prelievo assume particolare rilevanza, poiché i fenomeni di redistribuzione *post-mortem* possono determinare variazioni delle concentrazioni degli xenobiotici nei diversi distretti vascolari [149]. Per tale ragione, quando possibile, il sangue destinato alle analisi tossicologiche viene preferibilmente raccolto da sedi periferiche, considerate meno suscettibili ai fenomeni di redistribuzione rispetto al sangue proveniente dalle cavità cardiache o da sedi centrali [150].

L'intervallo *post-mortem*, le condizioni di conservazione e l'eventuale degradazione degli analiti devono pertanto essere considerati nell'interpretazione dei risultati [149].

La distinzione tra campioni ottenuti da soggetti viventi e campioni *post-mortem* risulta pertanto particolarmente importante in tossicologia forense, poiché le concentrazioni determinate nel sangue non riflettono necessariamente le medesime condizioni fisiologiche e farmacocinetiche. L'interpretazione del dato analitico deve quindi essere effettuata considerando la modalità e la sede di prelievo, le condizioni di conservazione del campione e il contesto tossicologico e medico-legale del caso.

3.2.3 Limiti del sangue intero in forma liquida

A fronte del suo valore interpretativo, l'impiego del sangue intero in forma liquida presenta alcuni limiti operativi. Il prelievo è una procedura invasiva, che richiede personale sanitario qualificato e il consenso dell'interessato, e comporta generalmente la raccolta di volumi dell'ordine di alcuni millilitri; ciò può risultare critico in popolazioni fragili o in ambito pediatrico [151].

Si aggiungono la necessità di mantenere la catena del freddo durante il trasporto e la conservazione, la limitata stabilità di numerosi analiti in matrice liquida, in particolare dei composti esterei e degli analiti labili, soggetti a idrolisi enzimatica e a degradazione microbica, nonché il rischio biologico connesso alla manipolazione di campioni potenzialmente infetti [151].

Sul piano analitico, l'effetto matrice nel sangue intero, dovuto alla presenza di centinaia di proteine denaturate, pone sfide rilevanti per un'analisi accurata e sensibile; la ricerca di metodiche e tecniche alternative rappresenta pertanto un ambito di indagine continuo [152].

3.3 Il campionamento a volume ridotto: i *Dried Blood Spots* (DBS)

La tecnica del campione di sangue essiccato (*Dried Blood Spot*, DBS) fu applicata per la prima volta al sangue umano nel 1963 da Guthrie e Susi per la rilevazione della fenilchetonuria in ampie popolazioni di neonati [153]. Da allora, i campioni DBS sono stati utilizzati non solo nello *screening* neonatale per i disturbi metabolici, ma anche in

studi epidemiologici, tossicocinetici e farmacocinetici, in *screening* diagnostici e nel monitoraggio terapeutico dei farmaci [151, 154, 155].

L'estensione alla tossicologia forense è più recente e si è consolidata parallelamente ai progressi nella sensibilità della spettrometria di massa tandem, che hanno reso possibile la quantificazione di analiti presenti in pochi microlitri di sangue [151, 154].

3.3.1 Principio della tecnica e modalità di raccolta

Il DBS si ottiene depositando piccoli volumi di sangue capillare (tipicamente 10-50 μL), prelevato mediante puntura del polpastrello o del tallone, su carte o cartoncini dedicati, che vengono successivamente lasciati essiccare all'aria e conservati a temperatura ambiente. Il supporto solido svolge una duplice funzione: fissa il campione arrestandone i processi degradativi e ne consente la conservazione e il trasporto senza catena del freddo [151, 156].

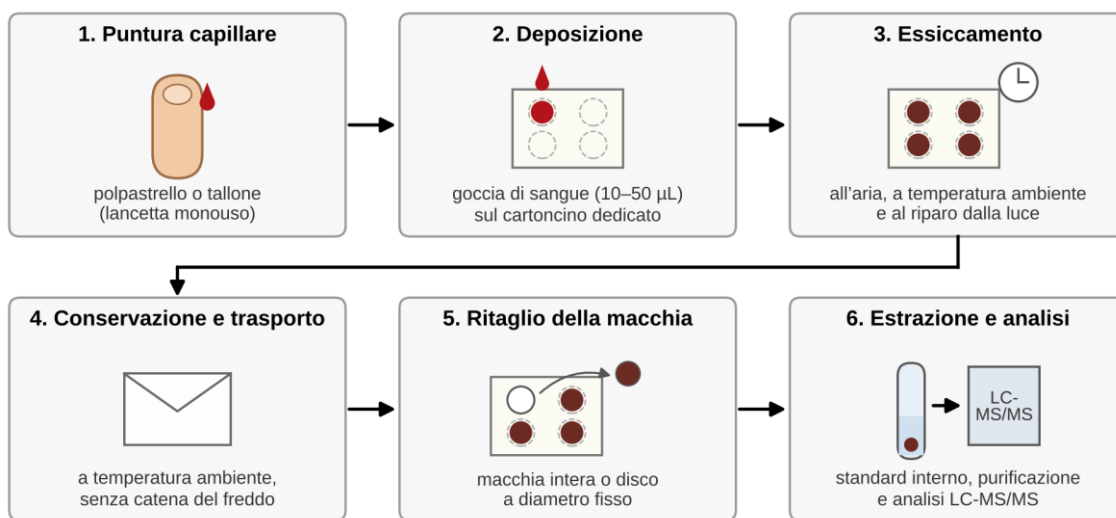


Figura 7: Rappresentazione schematica delle fasi di raccolta, conservazione e analisi dei campioni DBS. Adattato da [151, 156].

È una tecnica che richiede un volume di sangue relativamente basso: generalmente inferiore a 100 μL , nettamente inferiore rispetto ai 0,5 mL di sangue solitamente prelevati per la raccolta convenzionale di campioni di sangue. La procedura è di semplice esecuzione e non richiede necessariamente personale sanitario specializzato, il che ne amplia sensibilmente le possibilità di impiego. Inoltre, l'essiccazione del campione su supporto solido facilita le operazioni di conservazione e trasporto a temperatura ambiente,

rendendo possibile il campionamento anche in contesti decentralizzati o al di fuori delle strutture sanitarie [147, 151].

3.3.2 Vantaggi

Questa tecnica offre numerosi vantaggi, ad esempio un metodo di campionamento meno invasivo grazie alla possibilità di raccogliere il sangue mediante una semplice puntura al dito o al tallone [147]. È stata inoltre descritta una buona stabilità per molti analiti, ad esempio cocaina, zopiclone e alcune benzodiazepine, su schede di campionamento conservate a temperatura ambiente [151]. Ciò facilita la conservazione e il trasporto dei campioni, riducendo la necessità di refrigerazione.

Un altro vantaggio nell'utilizzo di DBS è un rischio biologico inferiore per gli operatori rispetto ai campioni di sangue liquido, riducendo al minimo il rischio di infezione da HIV e altri agenti patogeni infettivi [151]. L'uso dei DBS riduce dunque al minimo il rischio di infezioni da virus ematici, un aspetto critico nella gestione di campioni prelevati da consumatori di sostanze d'abuso. Inoltre, il supporto solido su carta rende i composti labili (come gli esteri) meno soggetti a degradazione. L'insieme di questi elementi, ossia l'economicità, la facilità di conservazione e le condizioni di spedizione dei DBS, in combinazione con il ridotto rischio biologico, ne supporta il potenziale nel campo dell'analisi tossicologica. I DBS possono rappresentare un'alternativa al prelievo di sangue convenzionale, in linea con le attuali tendenze dell'analisi biomedica, che mirano a ridurre i materiali biologici, i tempi e i costi di analisi [147].

3.3.3 Estrazione degli analiti e fattori critici

Nell'analisi dei campioni DBS, l'estrazione degli analiti rappresenta una fase cruciale. Il protocollo di estrazione applicato deve essere attentamente progettato per ottenere il recupero adeguato e una sensibilità analitica sufficiente, anche in considerazione del ridotto volume del campione disponibile. Durante questo processo, è necessario considerare diversi fattori. Un primo aspetto riguarda la natura del supporto: il tipo di carta utilizzata può infatti rilasciare sostanze interferenti durante il processo di estrazione del campione, con possibili ripercussioni sulla risposta analitica [151, 156].

Un ulteriore fattore, particolarmente rilevante, è l'ematocrito del campione, poiché ha molteplici effetti sull'estrazione dell'analita dai DBS. L'ematocrito del sangue determina

la viscosità del sangue stesso e, di conseguenza, la sua capacità di diffondere sulla carta da filtro. A parità di volume depositato, un campione ad ematocrito elevato dà origine a una macchia di superficie minore e di maggiore intensità cromatica, mentre un campione ad ematocrito basso produce una macchia più estesa. Questa diversa distribuzione può influenzare la quantità di analita presente nel disco prelevato e determinare una sovrastima o una sottostima della concentrazione, in funzione dell'ematocrito del campione rispetto a quello dei campioni utilizzati per la costruzione della retta di calibrazione [151, 156].

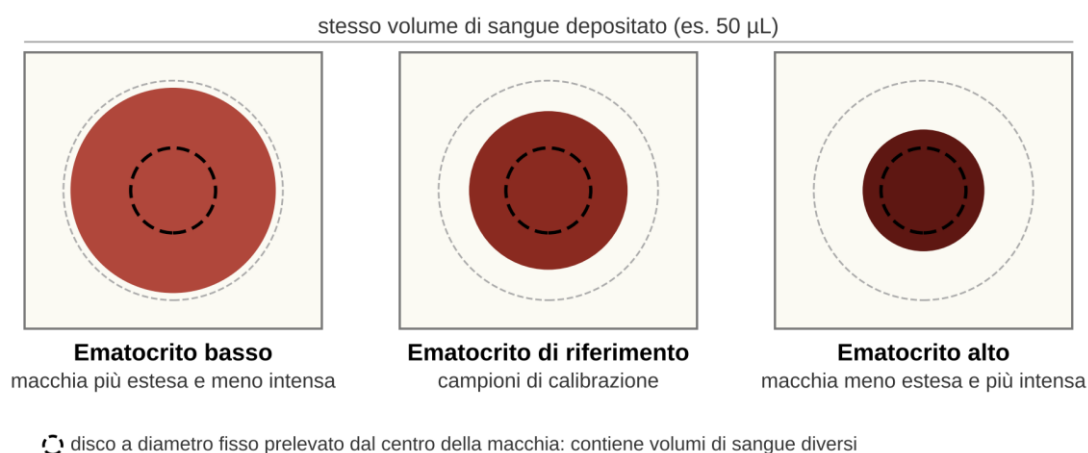


Figura 8: Effetto dell'ematocrito sull'estensione della macchia di sangue e sul volume di sangue contenuto in un disco a diametro fisso. Adattato da [151, 156].

Nelle analisi tossicologiche e nello *screening* dei farmaci devono essere inoltre considerati altri fattori, tra cui la tipologia del campione, ad esempio proveniente da soggetto vivente o *post-mortem*, e l'età della macchia di sangue, che possono influenzare la stabilità degli analiti e la loro successiva determinazione [154].

3.3.4 Limiti

I limiti dei DBS sono legati, in particolare, all'analisi quantitativa. Infatti, la quantificazione degli analiti di interesse si basa spesso sull'utilizzo di standard interni; nei metodi DBS questi vengono generalmente aggiunti al solvente utilizzato per l'estrazione della macchia e, pertanto, non consentono di compensare completamente le variabilità introdotte nelle fasi precedenti alla loro aggiunta [156].

Un ulteriore limite è rappresentato dalla necessità di utilizzare tecniche analitiche sufficientemente sensibili da consentire la rilevazione delle basse quantità di analiti presenti in pochi microlitri di sangue. Negli ultimi anni, il miglioramento della sensibilità

degli strumenti analitici, in particolare degli spettrometri di massa tandem, ha permesso la quantificazione dei componenti estratti dal DBS, nonostante il volume limitato di campione [151, 156].

La correlazione tra le concentrazioni di analiti misurate utilizzando DBS e sangue intero è spesso oggetto di discussione. Solitamente, i valori di riferimento determinati sono disponibili solo per campioni di plasma o siero. Pertanto, è necessario uno studio che confronti campioni di sangue intero DBS e campioni di siero o plasma [157]. Una buona correlazione tra i dati ottenuti con entrambi i metodi DBS e sangue intero porta a una maggiore fiducia nell'analisi quantitativa [156]. Sebbene la necessità di un piccolo volume di campione nella tecnica DBS sia vantaggiosa, può comportare particolari difficoltà nel raggiungimento della sensibilità desiderata.

4. LC-MS/MS

La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) rappresenta una delle principali tecniche analitiche di riferimento per la determinazione qualitativa e quantitativa di sostanze d'abuso in matrici biologiche. La tecnica combina l'elevata capacità separativa della cromatografia liquida con la selettività e sensibilità della spettrometria di massa, consentendo l'identificazione e la quantificazione di analiti presenti a concentrazioni estremamente basse anche in matrici biologiche complesse, quali sangue intero e DBS [158].

4.1 Cromatografia liquida

La cromatografia è una tecnica analitica e preparativa impiegata per la separazione dei componenti di una miscela, basata sulla loro differente distribuzione tra due fasi: una fase stazionaria, immobilizzata all'interno del sistema cromatografico, e una fase mobile, che scorre attraverso di essa. Durante il processo cromatografico, la fase mobile trasporta le sostanze attraverso la fase stazionaria, mentre le diverse interazioni chimico-fisiche che si instaurano tra gli analiti e le due fasi ne determinano la velocità di migrazione. La diversa affinità degli analiti per la fase stazionaria e per la fase mobile determina pertanto differenti tempi di ritenzione, consentendo la separazione dei singoli componenti della miscela [159, 160].

Nella cromatografia liquida (LC), la fase mobile è costituita da uno o più solventi allo stato liquido che trasportano la soluzione contenente gli analiti attraverso una colonna impaccata con la fase stazionaria. Ciascun analita stabilisce interazioni di diversa entità con le due fasi, attraverso interazioni deboli come forze di Van der Waals, interazioni idrofobiche, interazioni ioniche e legami a idrogeno [159]. Gli analiti caratterizzati da una maggiore affinità per la fase mobile percorrono la colonna più rapidamente, mentre quelli che interagiscono maggiormente con la fase stazionaria vengono trattiene più a lungo. La diversa ritenzione dei singoli analiti determina quindi differenti tempi di eluizione, consentendone la separazione e la successiva identificazione e quantificazione.

Il comportamento cromatografico di un analita può essere descritto quantitativamente attraverso il fattore di ritenzione (k), che esprime il grado di ritenzione dell'analita nella fase stazionaria rispetto alla fase mobile. Affinché due composti possano essere separati

è necessario che presentino differenti fattori di ritenzione; il rapporto tra i fattori di ritenzione di due analiti definisce il fattore di selettività (α). Durante la migrazione lungo la colonna, inoltre, la banda iniziale tende progressivamente ad allargarsi a causa di fenomeni diffusivi, con conseguente riduzione dell'efficienza della separazione cromatografica [159].

La classificazione dei diversi tipi di cromatografia si basa sulla natura delle interazioni che si instaurano tra i componenti del campione e le due fasi. Le forze coinvolte sono generalmente interazioni intermolecolari deboli, quali le forze di Van der Waals, i legami a idrogeno e, in alcuni casi le interazioni ioniche. I principali meccanismi di separazione cromatografica comprendono la ripartizione, l'adsorbimento, lo scambio ionico, l'esclusione dimensionale e l'affinità [160].

Nella cromatografia per ripartizione, la separazione si basa sulla diversa distribuzione degli analiti tra la fase mobile e una fase stazionaria liquida immobilizzata su un supporto solido. Nella cromatografia per adsorbimento, invece, la separazione è determinata dall'adsorbimento differenziale degli analiti sulla superficie della fase stazionaria, generalmente costituita da silice o da un materiale a base di silice. Nella cromatografia a scambio ionico, il principio di separazione si basa sull'equilibrio di scambio ionico tra gli ioni presenti nella fase mobile e i contro ioni associati ai gruppi ionici immobilizzati sulla fase stazionaria. La cromatografia ad esclusione dimensionale, invece, separa le molecole in funzione delle loro dimensioni: in questo tipo di cromatografia, la separazione avviene in base alla diversa capacità delle molecole di accedere ai pori della fase stazionaria, senza che siano necessarie specifiche interazioni chimiche con essa. Infine, la cromatografia di affinità si basa sull'interazione specifica e reversibile tra un ligando immobilizzato sulla fase stazionaria e la molecola bersaglio presente nel campione. Le condizioni di eluizione possono essere modificate, ad esempio, attraverso variazioni del pH o della forza ionica, al fine di favorire il distacco dell'analita dal ligando [160].

In funzione della polarità relativa delle due fasi si distinguono due modalità operative fondamentali. Nella cromatografia in fase normale, la fase stazionaria è più polare della fase mobile; di conseguenza, i soluti più polari vengono trattenuti maggiormente, mentre i componenti meno polari eluiscono per primi. Nella cromatografia in fase inversa, che rappresenta la modalità adottata nel presente lavoro, la polarità delle due fasi è invertita: la fase stazionaria è apolare, mentre la fase mobile è polare ed è generalmente costituita

da miscele acquose di metanolo o acetonitrile. In queste condizioni, i composti più polari presentano una minore ritenzione e tendono a eluire più rapidamente rispetto ai composti meno polari [159, 161].

4.2 Fase mobile

La fase mobile svolge un ruolo fondamentale nel determinare la separazione dei componenti di una miscela incognita. La sua composizione può essere modificata durante il processo cromatografico al fine di variare la forza eluente e favorire l'eluizione dei diversi componenti in tempi differenti. In cromatografia liquida, la fase mobile può essere costituita da un singolo solvente o, più frequentemente, da una miscela di solventi, tra cui acqua, metanolo e acetonitrile. Sebbene metanolo e acetonitrile siano entrambi miscibili con l'acqua, presentano proprietà chimico-fisiche differenti e determinano una diversa selettività cromatografica: il metanolo è in grado di agire sia come donatore sia come accettore di legami a idrogeno, mentre l'acetonitrile è caratterizzato principalmente da proprietà dipolari. La scelta del solvente organico può pertanto influenzare la ritenzione e l'ordine di eluizione di composti strutturalmente affini [159, 161].

L'analisi può essere condotta in condizioni isocratiche, mantenendo costante la composizione della fase mobile per tutta la durata della separazione, oppure in gradiente, variandone la composizione nel tempo secondo un programma prestabilito. L'eluizione isocratica viene favorita per miscele di analiti che presentano proprietà chimico-fisiche omogenee e presenta il vantaggio di garantire condizioni di separazione costanti. Nell'eluizione a gradiente, invece, la composizione della fase mobile viene progressivamente modificata, generalmente mediante l'aumento della frazione di solvente organico e, di conseguenza, la forza eluente della miscela. In questo modo, i composti più polari possono eluire nella fase iniziale, caratterizzata da una minore forza eluente, mentre quelli più lipofili vengono progressivamente eluiti con l'aumento successivo della frazione di solvente organico. L'eluizione a gradiente consente pertanto di analizzare, nell'ambito della stessa corsa cromatografica, miscele contenenti analiti caratterizzati da proprietà chimico-fisiche e fattori di ritenzione differenti, riducendo i tempi di analisi e mantenendo un'adeguata separazione cromatografica [159, 161].

4.3 Fase stazionaria

La fase stazionaria determina il meccanismo di ritenzione e, insieme alla fase mobile, contribuisce a definire la selettività della separazione cromatografica. Essa è costituita da particelle generalmente sferiche impaccate all'interno della colonna. Tra i parametri che influenzano l'efficienza della colonna rientrano il diametro delle particelle e la loro struttura interna [159, 162].

La riduzione del diametro delle particelle accorcia i percorsi diffusivi dell'analita e limita l'allargamento della banda cromatografica, favorendo una maggiore efficienza della separazione. Le colonne possono essere impaccate con particelle di dimensioni differenti; nei sistemi ad alte prestazioni vengono comunemente utilizzate particelle con diametro inferiore a 2 μm , mentre nelle colonne convenzionali sono frequenti particelle di dimensioni maggiori [162].

Per quanto riguarda invece la struttura interna della particella, accanto alle particelle totalmente porose si sono affermate le particelle a nucleo solido, o *core-shell*, costituite da un nucleo di silice non poroso rivestito da uno strato poroso superficiale [159, 162].

La superficie della silice espone gruppi silanologici (Si-OH), che ne determinano il carattere polare e debolmente acido. Su questi gruppi viene effettuata la derivatizzazione, mediante la quale catene idrocarburiche o altri gruppi funzionali vengono legati covalentemente al supporto, dando origine alle cosiddette fasi legate. Nella cromatografia in fase inversa vengono impiegate prevalentemente catene alchiliche di lunghezza variabile, prevalentemente C18 e C8, oppure gruppi aromatici quali fenile, fenil-esile e bifenile [159, 162].

La derivatizzazione non consente tuttavia di convertire la totalità dei silanoli disponibili e una frazione di essi rimane esposta sulla superficie della fase stazionaria. Questi silanoli residui, debolmente acidi, possono interagire elettrostaticamente con gli analiti basici protonati, dando origine a un meccanismo di ritenzione secondario che si aggiunge a quello idrofobico. La conseguenza pratica può essere un peggioramento della forma del picco, caratterizzato dalla presenza di fenomeni di *tailing* e da una riduzione dell'efficienza cromatografica, particolarmente evidente nel caso di composti basici quali le ammine. Il fenomeno può essere contenuto mediante *endcapping*, un trattamento che impiega silani a basso ingombro sterico per bloccare i siti reattivi residui, e attraverso

l'impiego di silice ad elevata purezza, caratterizzata da un basso contenuto di metalli in traccia che possono accentuare l'acidità dei silanoli. Nell'analisi delle fenetilamine, questi accorgimenti risultano determinanti per ottenere picchi simmetrici e una quantificazione affidabile [159, 162].

Tra le fasi legate impiegate nella cromatografia a fase inversa, la C18 rappresenta una delle fasi stazionarie maggiormente utilizzate, poiché la separazione si basa prevalentemente su interazioni idrofobiche. In alcune situazioni analitiche, tuttavia, le fasi alchiliche non consentono una risoluzione soddisfacente, in particolare quando gli analiti presentano elevata affinità strutturale, come nel caso di isomeri o di composti isobari; è stato ad esempio documentato come colonne C18 non permettano in alcuni casi una separazione sufficiente di steroidi isobari, rendendo necessario il ricorso a modifiche della fase stazionaria basate su gruppi bifenilici [163].

La fase stazionaria *biphenyl*, utilizzata in questo lavoro di tesi, è costituita da due anelli aromatici coniugati legati covalentemente al supporto silicico. Essa mantiene le interazioni dispersive tipiche delle fasi alchiliche, ma introduce ulteriori meccanismi di ritenzione: gli elettroni π disponibili sugli anelli aromatici possono infatti instaurare interazioni π - π con analiti dotati a loro volta di sistemi aromatici, alle quali si affiancano interazioni dipolo-dipolo. La capacità di formare legami a idrogeno risulta significativamente superiore rispetto a quella di una fase alchilica C18, indicando che il meccanismo di ritenzione non è riconducibile esclusivamente alle interazioni π - π . La fase *biphenyl* presenta pertanto una selettività ortogonale rispetto alla C18, che si traduce nella capacità di risolvere composti non adeguatamente separati dalle fasi alchiliche [164].

La scelta di una colonna a fase stazionaria *biphenyl* è stata motivata dalla natura degli analiti in esame: amfetamina, metamfetamina, MDMA e MDA sono tutte fenetilamine sostituite, caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico e da un'elevata somiglianza strutturale. L'impiego di tale fase stazionaria consente di ottenere una maggiore ritenzione e selettività rispetto a quanto ottenibile con una colonna C18 tradizionale [163, 164].

4.4 Componenti di un sistema LC

Un sistema di cromatografia liquida può essere descritto seguendo il percorso compiuto dal campione, dalla sua introduzione fino alla fase di rivelazione. Esso è costituito da

diversi componenti, quali la pompa, l'iniettore o autocampionatore, la colonna cromatografica, il rivelatore e l'unità di elaborazione dei dati [159, 161].

Cromatografia liquida (LC)

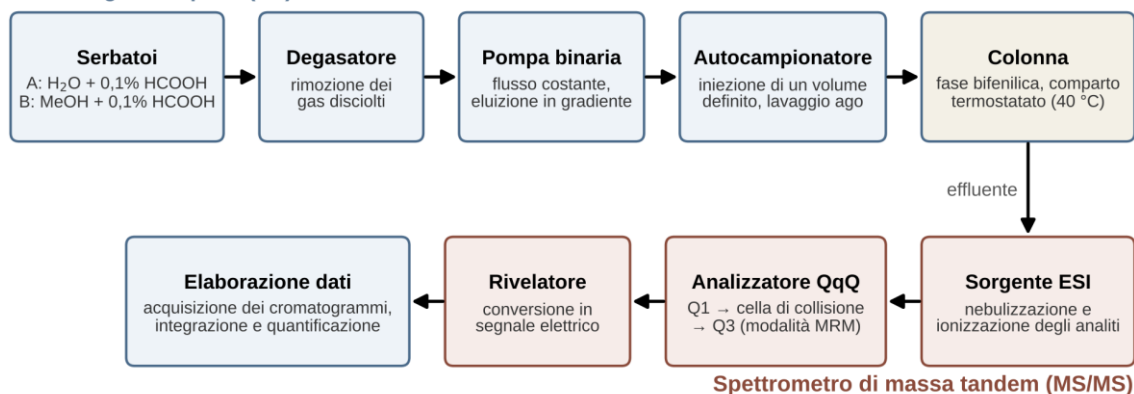


Figura 9: Schema a blocchi di un sistema LC-MS/MS. Adattato da [159, 161].

Il sistema di erogazione della fase mobile comprende i serbatoi contenenti i solventi e la pompa, che deve garantire una portata costante nel tempo: eventuali oscillazioni si tradurrebbero infatti in una scarsa riproducibilità dei tempi di ritenzione e in rumore di fondo sul segnale. Per questa ragione vengono impiegate pompe a pistoncini multipli, nelle quali il funzionamento sfasato di due pistoncini consente a uno di erogare mentre l'altro si ricarica, ottenendo un flusso sostanzialmente privo di pulsazioni. Le configurazioni binarie o quaternarie, dotate di più canali di aspirazione, permettono inoltre di miscelare i solventi in proporzioni variabili nel tempo e quindi di realizzare eluizioni in gradiente. A monte della pompa è generalmente presente un sistema di degasaggio, necessario poiché i gas disciolti nei solventi possono formare bolle in corrispondenza delle variazioni di pressione, alterando l'erogazione della fase mobile e destabilizzando la linea di base [159].

Il campione viene quindi introdotto nel sistema mediante un autocampionatore, che preleva un volume definito di estratto e lo introduce nel flusso della fase mobile attraverso una valvola a più vie dotata di *loop* di campionamento [159].

Rispetto all'iniezione manuale, il sistema automatizzato consente di processare sequenze estese riducendo la variabilità legata all'operatore. Un aspetto rilevante ai fini della qualità del dato riguarda i cicli di lavaggio dell'ago, previsti tra iniezioni successive: una loro insufficiente efficacia può infatti determinare fenomeni di trascinamento (*carry-over*), con comparsa di segnale spurio nel campione analizzato dopo uno a concentrazione

elevata. Per questa ragione il *carry-over* costituisce uno dei parametri da verificare sistematicamente in sede di validazione [159, 161].

Il campione viene quindi convogliato verso la colonna cromatografica, alloggiata in un comparto termostato.

Il controllo della temperatura non rappresenta un semplice accessorio, poiché la temperatura influenza la viscosità della fase mobile, i coefficienti di diffusione e le costanti di equilibrio che governano la ripartizione degli analiti tra le due fasi, con effetti diretti sui tempi di ritenzione e sulla forma dei picchi. Mantenere la colonna a temperatura costante, superiore a quella ambiente, contribuisce quindi a garantire la riproducibilità della separazione tra sequenze analitiche condotte in giornate diverse, requisito indispensabile per un metodo quantitativo [159, 161].

All'uscita della colonna, l'effluente raggiunge il rivelatore, che converte il segnale chimico in un segnale elettrico misurabile.

La scelta del rivelatore dipende dalla natura degli analiti, dalla complessità della matrice e dalla sensibilità richiesta: nelle applicazioni classiche si ricorre a rivelatori ad assorbimento ultravioletto, a fluorescenza o a indice di rifrazione, mentre nei sistemi LC-MS/MS il ruolo di rivelatore è affidato allo spettrometro di massa, che consente di affiancare alla separazione cromatografica un'identificazione basata sul rapporto massa/carica e sulle frammentazioni caratteristiche di ciascun composto. Tale accoppiamento risulta particolarmente vantaggioso in ambito tossicologico, dove le concentrazioni attese sono basse e le matrici possono essere complesse. Il software di gestione coordina infine i diversi moduli, acquisisce i cromatogrammi, ne integra i picchi e consente l'identificazione e la quantificazione degli analiti; la fase mobile esausta viene convogliata in un contenitore di raccolta destinato allo smaltimento [158, 161].

4.5 Spettrometro di massa

La spettrometria di massa (MS) è una tecnica analitica qualitativa e quantitativa altamente efficace, utilizzata per identificare e quantificare un'ampia gamma di analiti clinicamente rilevanti [165]. I dati di spettrometria di massa sono generalmente espressi in termini di rapporto massa-carica (m/z), dove m rappresenta la massa dello ione, espressa in dalton (Da), e z il numero di cariche presenti sullo ione analizzato [166].

Gli spettrometri di massa convertono le molecole in ioni, che vengono successivamente manipolati utilizzando campi elettrici e magnetici [167]. Questo processo coinvolge tre componenti principali:

- Sorgente di ioni: il campione viene introdotto nello spettrometro di massa e sottoposto a un processo di ionizzazione, che determina la formazione degli ioni [168]
- Analizzatore di massa: gli ioni vengono separati all'interno dello strumento in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z).
- Rivelatore: gli ioni vengono rilevati e il segnale generato viene successivamente elaborato per la rappresentazione dello spettro di massa.

Gli atomi e le molecole devono essere preventivamente ionizzati prima di poter essere accelerati e analizzati all'interno dello spettrometro di massa [169]. La molecola del campione introdotta nello spettrometro di massa viene ionizzata nella sorgente di ionizzazione, mediante la formazione di uno ione positivo o negativo. Una volta ionizzata può andare incontro a frammentazione, con formazione di ioni di dimensioni inferiori, che vengono successivamente separati nell'analizzatore di massa in base al loro rapporto massa/carica. Le specie neutre non vengono rilevate dallo spettrometro di massa poiché non rispondono ai campi elettrici e magnetici utilizzati per il loro trasferimento e separazione. Dopo la separazione, gli ioni raggiungono il rivelatore, che ne rileva l'intensità del segnale [167].

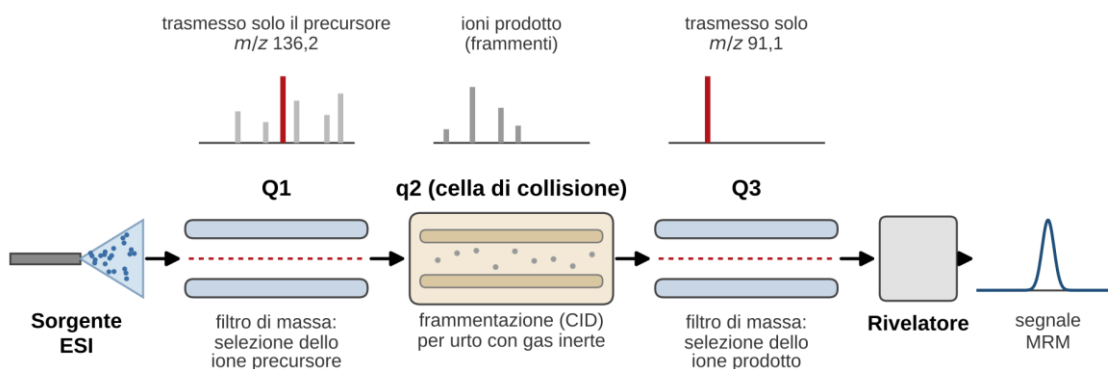
La ionizzazione elettrospray (ESI) rappresenta una delle principali tecniche di ionizzazione impiegate per produrre ioni adatti all'analisi mediante spettrometria di massa. Tuttavia, anche altre tecniche di ionizzazione a pressione atmosferica, come la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI) e la fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI), possono essere accoppiate alla LC. La scelta di una determinata tecnica di ionizzazione dipende principalmente dalla polarità degli analiti in soluzione e dall'affinità protonica in fase gassosa. La LC-ESI con MS a triplo quadrupolo (QqQ) è la tecnica più utilizzata per la determinazione qualitativa e quantitativa di composti non volatili mirati in applicazioni forensi e nel settore alimentare [170–172].

La risposta in ESI è strettamente influenzata dalla composizione della fase mobile e del campione, nonché dalla presenza di composti interferenti coeluiti, che possono interferire con il processo di ionizzazione. Questi fenomeni sono noti come “effetti matrice” (ME)

e possono alterare la risposta degli analiti, causando la soppressione o l'amplificazione del segnale [152, 173]. La presenza di ME può introdurre alcune criticità analitiche nell'analisi quantitativa mediante LC-MS, quali una riduzione della sensibilità, una risposta non lineare e una minore precisione. L'accoppiamento della cromatografia liquida con la spettrometria di massa ha inoltre consentito di superare numerose limitazioni nell'identificazione e nell'elucidazione strutturale di composti incogniti [171].

Lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo è ampiamente utilizzato nelle analisi quantitative grazie alla combinazione di elevata sensibilità, selettività, velocità di scansione e ampio intervallo dinamico [167, 171]. Gli strumenti a triplo quadrupolo vengono generalmente impiegati in modalità di monitoraggio di reazioni multiple (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM).

La modalità MRM prevede la selezione dello ione di interesse nel primo quadrupolo, la sua frammentazione nel secondo quadrupolo e infine la successiva selezione di uno o più ioni prodotto nel terzo quadrupolo per il rilevamento [167].



Esempio: transizione MRM di quantificazione dell'amfetamina, m/z 136,2 $\rightarrow$ 91,1

Figura 10: Principio di funzionamento di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo in modalità MRM. Adattato da [167, 171].

Tipicamente, per ciascun ione precursore viene monitorato uno ione prodotto quantitativo, mentre uno o più ulteriori ioni prodotto possono essere selezionati come ioni di conferma [171].

Anche gli strumenti a quadrupolo-tempo di volo (QTOF) o a trappola orbitale (Orbitrap) vengono utilizzati per lo *screening* e consentono di ottenere misure accurate della massa degli ioni di interesse. Grazie a questa caratteristica, è possibile utilizzare una finestra di intervallo di massa ristretta per ottenere una maggiore specificità, senza ricorrere

necessariamente alla frammentazione della molecola come avviene negli strumenti a triplo quadrupolo. Questo può rappresentare un vantaggio significativo nell'analisi di piccole molecole che presentano una scarsa efficienza di frammentazione o che non producono uno ione dominante [174].

Anche quando è possibile assegnare la corretta composizione elementare a un analita sconosciuto tramite lo spettro di massa, diverse strutture chimiche potrebbero comunque interferire con l'identità del composto. Pertanto, la spettrometria di massa tandem (MS/MS) o multistadio (MS^n) combinata con la frammentazione dell'analita sconosciuto rappresenta un passaggio successivo fondamentale per la determinazione della struttura [175].

Esistono diverse tecniche di frammentazione mediante spettrometria di massa, che possono determinare l'attivazione di meccanismi di frammentazione alternativi per uno stesso analita sconosciuto. Per la determinazione strutturale di piccole molecole, le tecniche più frequentemente utilizzate sono la CID a fascio, condotta nella cella di collisione di strumenti a triplo quadrupolo (QQQ) o a quadrupolo-tempo di volo (Q-TOF), e la CID a eccitazione risonante, utilizzata nelle trappole ioniche lineari o tridimensionali e celle ICR. È importante notare che possono esistere differenze significative tra gli spettri MS/MS ottenuti tramite CID a fascio e quelli ottenuti mediante CID a eccitazione risonante. Tuttavia, l'approccio all'identificazione strutturale rimane lo stesso [175, 176].

5. Scopo della tesi

La presente tesi si inserisce nell'ambito del progetto di ricerca PRIN NO PANIC (*New and Old Psychoactive drugs Abuse and Neuroenhancers use Investigation among Current University Students*), finalizzato allo studio del consumo di sostanze psicoattive e neurostimolanti nella popolazione universitaria mediante l'integrazione di dati anamnestici e analisi tossicologiche su matrici biologiche. In tale contesto, il lavoro ha avuto come obiettivo lo sviluppo e la validazione, secondo le linee guida internazionali vigenti, di un metodo analitico basato su cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) per la determinazione quantitativa di amfetamina, metamfetamina, 3,4-metilendiossimetamfetamina (MDMA) e 3,4-metilendiossiamfetamina (MDA) in sangue intero e campioni di *dried blood spots* (DBS) [177].

L'introduzione della matrice DBS è finalizzata a ridurre il volume di sangue necessario per il campionamento, semplificare le procedure di raccolta, trasporto e conservazione dei campioni e ampliare le potenzialità applicative del protocollo analitico. Contestualmente, l'inclusione degli stimolanti oggetto di studio consente di estendere il pannello delle sostanze ricercate nell'ambito del progetto, migliorando la capacità di identificare l'esposizione a sostanze psicoattive mediante un approccio analitico sensibile, selettivo e applicabile sia in ambito clinico sia tossicologico-forense.

6. Materiali e metodi

6.1 Sostanze pure e reagenti

Sono stati utilizzati i seguenti standard tutti in dotazione al Laboratorio di Analisi Chimico-Tossicologiche del Dipartimento di Medicina Legale, Scienze Forensi e Farmaco-tossicologiche “Antonio Fornari”:

- Metamfetamina 1 mg/mL in etanolo (Lipomed AG, Arlesheim, Svizzera);
- MDMA 1 mg/mL in metanolo (Lipomed AG, Arlesheim, Svizzera);
- MDA 0,1 mg/mL in metanolo (Cerilliant Corporation, Texas, USA);
- MDMA-D5 1 mg/mL in metanolo (Cerilliant Corporation, Texas, USA);
- Amfetamina 1 mg/mL in metanolo (Cerilliant Corporation, Texas, USA).

Per quanto riguarda i solventi, tutti corrispondenti ai criteri di purezza necessari per l'esecuzione dell'analisi mediante LC-MS/MS, sono stati impiegati:

- Metanolo (Carlo Erba, Italia);
- Tampone fosfato pH 6;
- HCl 0.1 M (0,828 mL HCl 37% in 100mL di acqua purificata di grado Milli-Q);
- Mix Diclorometano-Isopropanolo 8:2 con 2% di NH₄OH;
- Acqua purificata di grado Milli-Q, prodotta utilizzando la strumentazione MilliQ Simplicity 185 (Millipore);
- Acqua bidistillata.

L'acqua purificata di grado Milli-Q utilizzata per la preparazione delle fasi mobili utilizzate nella cromatografia liquida è stata ottenuta mediante un sistema di purificazione Chemi Plus mod. (General Waters, Bologna, Italia) e successivamente acidificata con acido formico (Fluka, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) fino a una concentrazione dello 0.1% v/v.

6.2 Vetreria, materiali da laboratorio e strumenti

Nel corso delle analisi finalizzate a questo progetto, sono state utilizzate le seguenti apparecchiature di laboratorio:

- Bilancia Analitica AE 260 Delta Range, “Mettler Toledo”, Milano, Italia;

- Colonne SPE Agilent Bond Elut Certify;
- Pipette Eppendorf a volume fisso e variabile (1-20 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL , 50 μL , 1000 μL , 500-5000 μL);
- Pipette Pasteur di plastica;
- Provette di vetro da 10 mL a fondo conico;
- Agitatore *vortex* “VELP scientifica”, Monza Brianza, Italia;
- Parafilm®;
- *Dried Blood Spot* (DBS, *Specimen Collection Paper*, Whatman™, GE Healthcare Ltd, Forest Farm Industrial Estate, Cardiff, UK)
- *Vials* in plastica (0,3 mL PP Snap Ring Micro-Vials, 32x11,6 mm *transparent*);
- Tappi per *vial*;
- Forbici;
- Centrifuga “IEC CL10” (Thermo electron corporation);
- Sonicatore (Stimin s.a.s, Milano, Italia)
- Camera estrattiva Supelco® Visiprep™ 12 DL (Merck);
- Cilindro graduato 50 mL;
- Cilindro graduato 100 mL;
- Tappi di plastica monouso;
- Evaporatore a flusso di azoto “Reacti-Therm™”, (Pierce);
- UPLC Agilent Serie 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipaggiata con colonna analitica Biphenyl Kinetex® 150x2.1 mm, 2.6 μm *particle size*, 100 Å-Phenomenex;
- Spettrometro di massa a triplo quadrupolo SCIEX Qtrap 6500+ (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Foster City, CA, USA), nel quale il terzo quadrupolo può funzionare da trappola ionica lineare, equipaggiato con sorgente ionica ESI Turbo V™.

6.3 Campioni biologici

Le analisi finalizzate all’ottimizzazione del metodo LC-MS/MS per la determinazione di Amfetamina, Metamfetamina, MDMA ed MDA sono state condotte analizzando sia campioni di sangue intero liquido sia i corrispondenti campioni in formato DBS (*Dried Blood Spot*). Entrambe le tipologie sono state allestite a partire da matrice ematica

“bianca”, priva degli analiti di interesse, fornita da volontari del laboratorio, nonché da campioni precedentemente risultati negativi nell’ambito di indagini relative alle Commissioni Medico Locali Patenti e ai SERT locali. Tali campioni sono stati addizionati degli standard analitici e dello standard interno di riferimento, al fine di ottenere campioni idonei all’ottimizzazione dei parametri analitici del metodo.

Al momento, non sono ancora pervenuti al Laboratorio di Tossicologia Forense dell’Università di Pavia campioni reali positivi alle sostanze di interesse, per cui non è stato possibile, nell’ambito di questo elaborato, procedere con l’applicazione delle metodiche descritte su questo tipo di campione.

6.3.1 Preparazione del campione

6.3.1.1 Allestimento dei campioni di sangue

La procedura riguardante la preparazione dei campioni di sangue liquido intero è la seguente:

- prelevare 500 μL di sangue “bianco” e raccogliarli in una provetta di vetro da 10 mL a fondo conico;
- aggiungere gli standard degli analiti a concentrazione nota per ciascun punto della retta di calibrazione;
- da ogni provetta contenente il sangue addizionato degli standard a concentrazione nota prelevare 50 μL , aggiungere lo standard interno anch’esso a concentrazione nota e 500 μL di tampone fosfato a pH 6 in una seconda provetta;
- sottoporre i campioni a *vortex* e centrifuga a 4000 rpm per 5 minuti in vista della successiva purificazione in fase solida (SPE).

6.3.1.2 Allestimento dei DBS (*Dried Blood Spot*)

Per quanto concerne i campioni DBS, la fase preliminare di trattamento del sangue, antecedente alla deposizione (*spotting*) sui cartoncini, ha seguito il medesimo protocollo adottato per i campioni di sangue intero liquido descritto in precedenza. Si è quindi proceduto come descritto nei seguenti passaggi:

- depositare un’aliquota di 50 μL di sangue intero, addizionato degli standard a concentrazione nota, sulle apposite aree dei cartoncini per DBS;

- Lasciare essiccare all'aria i supporti, a temperatura ambiente e al riparo dalla luce diretta, per una notte (*overnight*, ON), così da predisporli alla successiva purificazione in fase solida;
- terminato l'essiccamento, ritagliare ed inserire l'area del cartoncino DBS corrispondente al campione in una provetta di vetro a fondo conico;
- aggiungere ad ogni campione 500 μL di tampone fosfato a pH 6 e lo standard interno a concentrazione nota; vortexare, dunque, i campioni, sonicarli per 10 minuti e centrifugarli a 4000 rpm per 5 minuti;
- Al termine di tali passaggi i campioni sono risultati pronti per la successiva purificazione in fase solida (SPE).

6.3.2 Purificazione mediante SPE

Per entrambe le preparazioni (sangue intero e DBS), si procede con la fase di purificazione mediante estrazione in fase solida. Le colonnine SPE sono state condizionate inizialmente con 2 mL di metanolo, seguiti da 2 mL di tampone fosfato. I campioni sono stati quindi caricati e la fase stazionaria è stata lavata sequenzialmente con 2 mL di acqua, 3 mL di HCl 0,1 M e 3 mL di metanolo. L'eluizione degli analiti è stata effettuata con 2 mL di miscela estrattiva diclorometano/isopropanolo (8:2 v/v) con 2% di NH_4OH . L'eluato ottenuto è stato evaporato sotto flusso di azoto e successivamente risospeso in una miscela di 20 μL di metanolo ed 80 μL di acqua, preparando così il campione per l'iniezione e l'analisi mediante LC-MS/MS.

6.3.3 Caratterizzazione delle sostanze in MS/MS

La caratterizzazione delle sostanze attraverso ionizzazione e successiva separazione in triplo quadrupolo si è articolata in due passaggi analitici: la preparazione degli standard e l'ottimizzazione dei parametri di ionizzazione e rivelazione MS/MS. Per ciascuna sostanza è stata utilizzata una soluzione certificata: Amfetamina, Metamfetamina, MDMA ed MDA ad una concentrazione di 1 mg/mL. Per ottimizzare i parametri di ionizzazione e di rivelazione MS/MS, è stato necessario preparare soluzioni a 1 $\mu\text{g/mL}$ in metanolo. Sono state preparate le singole soluzioni degli analiti, ad eccezione dell'MDMA-D5, il cui standard è già impiegato nel laboratorio e per il quale i parametri analitici risultano già ottimizzati. La soluzione a 1 $\mu\text{g/mL}$ di ogni sostanza è stata infusa

direttamente nello spettrometro di massa con un flusso di 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ tramite pompa a siringa. Il flusso di liquido in ingresso viene nebulizzato grazie al potenziale elettrico applicato all'ago (*ionspray voltage*) e al gas di nebulizzazione (Gas 1). Il nebulizzato viene indirizzato verso le lenti elettrostatiche poste all'ingresso dell'analizzatore di massa. Il foro posto tra le lenti stesse agisce da camera di desolvatazione ed evita l'entrata di vapori neutri di solvente nella zona dell'analizzatore. Questo effetto si ottiene grazie all'applicazione del *curtain gas* e di una differenza di potenziale, detta *Declustering potential* (DP), tra il foro e l'ago. Maggiore è la differenza di potenziale applicata maggiore sarà la desolvatazione. Il range di lavoro del DP in genere si aggira tra 0 e 200 V. Gli ioni passano quindi attraverso un primo quadrupolo detto Q0, che serve a focalizzare e guidare gli ioni lungo il percorso verso l'analizzatore. Questo processo è regolato da un parametro detto *Entrance potential* (EP), che generalmente viene impostato a 10 V per gli ioni in *positive mode*. Il Q0 serve a focalizzare e accelerare gli ioni ma non è in grado di selezionare e frammentare gli analiti. Per ciascun analita è stata individuata la polarità di ionizzazione utile a garantire le migliori condizioni di sensibilità analitica. Gli ioni generati, detti ioni pseudomolecolari o precursori ($[\text{M}+\text{H}]^+$ o $[\text{M}-\text{H}]^-$) vengono isolati nel primo quadrupolo (Q1), entrano nella cella di collisione (Q2), dove vengono frammentati. Alcuni parametri relativi alla cella di collisione possono essere ottimizzati in modo tale da frammentare lo ione precursore e individuarne i frammenti più abbondanti. In particolare, per ciascuno ione molecolare e per ciascun frammento generato sono stati valutati i seguenti parametri: *Collision Energy* (CE), *Collision Cell Exit Potential* (CXP) e *Collision Gas* (CAD). La *Collision Energy* (CE) è una differenza di potenziale tra il Q0 e la cella di collisione Q2 ed equivale all'energia che lo ione precursore riceve per essere accelerato nel Q2. Qui lo ione collide con il gas di collisione e si frammenta, generando gli ioni prodotto. In modalità positiva il CE può essere variato da 5 a 180 eV, mentre in modalità negativa da -5 a -180 eV. Il *Collision Cell Exit Potential* (CXP) ha la funzione di concentrare e accelerare gli ioni in uscita dalla cella di collisione (Q2) verso il terzo quadrupolo (Q3). Il CXP è relativo al Q3 e può variare tra 0 e 55 V, per gli ioni positivi, e tra -55 e 0 V per quelli negativi. Il *Collisionally Activated Dissociation* (CAD) consiste nel processo di collisione degli ioni precursori con un gas neutro al fine di frammentare la molecola in ioni prodotto. Il *Collision Gas*, relativo al Q2, è stato mantenuto al livello $5 \cdot 10^{-5}$ torr per tutte le reazioni di frammentazione. La modalità operativa adottata consiste nel selezionare uno ione precursore nel primo

quadrupolo (Q1) e nel monitorare più ioni prodotto nel Q3, riuscendo così a monitorare diverse transizioni ione precursore → ione prodotto; questa modalità è nota come *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). L'acquisizione e l'elaborazione dei dati sono state effettuate con l'ausilio del software SCIEX OS® (versione 3.4.5.828 Applied Biosystems/MDS SCIEX). Ai fini di una maggiore chiarezza è stato ritenuto opportuno ed utile riportare in Tabella 1, che segue, i parametri di frammentazione e ionizzazione ottimizzati per ciascun analita preso in esame. In particolare, in tabella sono riportati i parametri con il maggior impatto diagnostico quali: l'*Entrance potential* (EP), il *Declustering Potential* (DP), il *Collision Energy* (CE) e il *Collision Cell Exit Potential* (CXP).

6.3.4 Sviluppo del metodo cromatografico

Una volta ottimizzati i parametri di ionizzazione di tutte le molecole di interesse, si è proceduto allo studio di un metodo cromatografico che soddisfacesse tutte le esigenze analitiche necessarie a garantire la corretta separazione e identificazione di ciascuna sostanza analizzata.

Tabella 1: Parametri di ionizzazione e transizioni ioniche degli analiti

ANALITA	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
Amfetamina	136,2	91,1	48	8	35	4
	136,2	119,1	48	8	29	6
MDMA	194,2	105,1	48	8	25	6
	194,2	133	48	8	28	6
MDA	180,2	133,1	44	12	38	4
	180,2	135,1	44	12	20	8
Metamfetamina	150,1	91,3	50	7	25	8
	150,1	119,1	50	7	16	7
MDMA-D5	199	165	80	10	19	15
	199	135	80	10	20	15

*Le righe evidenziate in rosso si riferiscono alle transizioni MRM utilizzate per la quantificazione dell'analita

L'analisi cromatografica è stata eseguita con un sistema UPLC Agilent 1260 Infinity II, costituito da un sistema di degasaggio sottovuoto, da una pompa binaria e da un microautocampionatore mantenuto a temperatura ambiente. L'ago di iniezione è sottoposto ad un triplice lavaggio con metanolo prima di ogni iniezione. La fase mobile

consiste in una miscela di acido formico 0.1% in acqua (fase A) e acido formico 0,1% in metanolo (fase B). La separazione cromatografica è stata effettuata con una colonna analitica Biphenyl Kinetex® 150x2.1 mm, 2.6 μm *particle size*, 100 Å-Phenomenex, mantenuta a 40°C durante tutta l'analisi. Prima dell'inizio dell'analisi la colonna viene equilibrata per 20 minuti. Il flusso è stato impostato a 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ ed il gradiente cromatografico utilizzato è stato il seguente: 0-2 min: 5% di B, 2-5 min: 5-70% B, 5-6 min: 70-90% B, 6-10 min: 90% di B, 10,1-18 min: 5% B.

Tabella 2: Parametri di eluizione cromatografica

Tempo (min)	Flusso ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	350	95	5
2	350	95	5
5	350	30	70
6	350	10	90
10	350	10	90
10,01	350	95	5
18	350	95	5

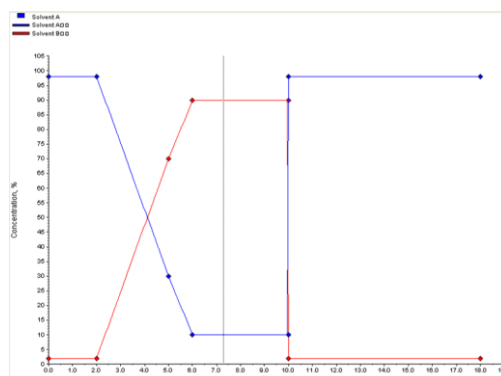


Figura 11: Rappresentazione grafica del gradiente cromatografico (fase A in blu, fase B in rosso)

6.3.5 Ottimizzazione dei parametri di ionizzazione in LC-ESI-MS/MS

Durante le analisi LC-ESI-MS/MS è stato necessario adattare i parametri della sorgente di ionizzazione al flusso di fase mobile prescelto (350 $\mu\text{L}/\text{min}$, contro i 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ impiegati nella fase di caratterizzazione delle singole molecole). Per garantire una ionizzazione ottimale a un flusso di 350 $\mu\text{L}/\text{min}$, la sorgente ESI è stata impostata con i seguenti parametri forniti dal produttore:

Tabella 3: Parametri di ionizzazione ESI

<i>Curtain gas</i>	35
Temperatura della sorgente	350°C
Gas 1	40
Gas 2	50
<i>Declustering potential (DP)</i>	0-100 V (specifico per ogni sostanza)

6.4 Rette di calibrazione

La preparazione della curva di calibrazione è stata eseguita per tutte le molecole in esame: Amfetamina, Metamfetamina, MDMA ed MDA. Per la costruzione dei punti della curva sono state impiegate le rispettive soluzioni madri, dalle quali sono state effettuate diluizioni successive per ottenere le soluzioni mix di lavoro. Al fine di uniformare le concentrazioni delle quattro sostanze, le soluzioni di Amfetamina, Metamfetamina ed MDMA, inizialmente a 1 mg/mL, sono state diluite 1:10 con metanolo (10 µL di soluzione madre + 90 µL di metanolo), così da ottenere soluzioni alla stessa concentrazione dell'MDA (0,1 mg/mL). Successivamente, sono stati preparati 4 mL di una soluzione mix a 1000 ng/mL prelevando 40 µL delle quattro soluzioni a 0,1 mg/mL e completando con 3840 µL di metanolo. Dalla soluzione mix a 1000 ng/mL sono state poi ottenute le soluzioni a 100 ng/mL e 10 ng/mL mediante diluizioni 1:10 e 1:100, rispettivamente.

Inoltre, sono state preparate soluzioni a 1000 ng/mL e 100 ng/mL dello standard interno (MDMA-D5). Si è partiti da una soluzione madre di MDMA-D5 a 1 mg/mL, portata a 0,1 mg/mL mediante diluizione 1:10. Da quest'ultima sono stati preparati 4 mL della soluzione a 1000 ng/mL, prelevando 40 µL della soluzione a 0,1 mg/mL e completando con 3960 µL di metanolo. Successivamente, dalla soluzione a 1000 ng/mL è stata effettuata una diluizione 1:10 per ottenere quella a 100 ng/mL.

Per la costruzione delle curve di calibrazione sono stati selezionati i seguenti punti:

- “Bianco”
- 5 ng/mL
- 10 ng/mL
- 50 ng/mL

- 100 ng/mL
- 250 ng/mL
- 500 ng/mL
- 1000 ng/mL

Il “bianco” è stato ottenuto addizionando 500 μ L di tampone fosfato a pH 6 e 50 μ L di standard interno ai 50 μ L di sangue; il punto a 1000 ng/mL è stato ottenuto addizionando 500 μ L della soluzione mix a 1000 ng/mL contenente Amfetamina, Metamfetamina, MDMA ed MDA. Sempre dalla soluzione mix 1000 ng/mL sono stati aggiunti 250 μ L per ottenere il punto a 500 ng/mL e 125 μ L per ottenere il punto a 250 ng/mL. Partendo poi dalla soluzione mix a 100 ng/mL sono stati ottenuti i punti 100 ng/mL e 50 ng/mL addizionando rispettivamente 500 μ L e 250 μ L. Infine i punti a 10 ng/mL e 5 ng/mL sono stati ottenuti addizionando 500 μ L e 250 μ L della soluzione mix a 10 ng/mL. Per tutti i punti della retta di calibrazione sono stati aggiunti 50 μ L della soluzione di standard interno MDMA-D5 a 100 ng/mL.

Ciascuna curva di calibrazione è stata costruita riportando in ascissa (X) le concentrazioni note dell'analita e in ordinata (Y) il rapporto tra l'area del picco dell'analita e quella del corrispondente standard interno. La relazione tra le due grandezze è descritta dall'equazione della retta di regressione lineare, il cui coefficiente di determinazione (R^2) esprime il grado di linearità della risposta strumentale.

7. Sviluppo dei metodi

Trattandosi di metodi bioanalitici, lo sviluppo e l'ottimizzazione delle procedure sono stati condotti in conformità alle linee guida ICH M10 [177].

7.1 Studio di selettività

La selettività è definita come capacità del metodo bioanalitico di misurare inequivocabilmente e differenziare gli analiti da altri componenti che potrebbero essere presenti, quali impurità, metaboliti, prodotti di degradazione o componenti della matrice [177]. In ciascuna analisi è stato processato un campione di sangue “bianco”, in tutto e per tutto uguale al campione reale da analizzare ma privo degli analiti di interesse, seguendo le procedure descritte nei paragrafi precedenti. Il “bianco” è stato utilizzato per correggere il segnale di fondo, migliorare la precisione della calibrazione e assicurarsi che non ci siano interferenze o contaminazioni nei reagenti.

7.2 Sensibilità analitica

La sensibilità di un metodo analitico indica la sua capacità di rilevare la presenza di un analita anche a concentrazioni molto basse. Questo aspetto è misurato attraverso due parametri fondamentali: il limite di rilevabilità (LOD, *Limit of Detection*) e il limite di quantificazione (LOQ, *Limit of Quantification*). Il LOD è definito come la concentrazione di analita in grado di generare un picco cromatografico che abbia un rapporto tra segnale e rumore superiore o uguale a 3 ($S/N \geq 3$), e rappresenta la concentrazione minima di analita che lo strumento è in grado di rivelare [178]. Il LOQ indica la quantità di analita in grado di generare un picco con un rapporto tra segnale e rumore maggiore o uguale a 10 ($S/N \geq 10$) e/o rappresenta comunque la concentrazione minima di analita che lo strumento è in grado di rivelare e quantificare [178]. LOD e LOQ sono stati valutati iniettando campioni di sangue “bianchi” addizionati con soluzioni standard contenenti opportune concentrazioni di ciascuna molecola presa in esame.

7.3 Linearità e variabilità del dato

La linearità è un parametro fondamentale per un'analisi quantitativa ed è stata valutata tramite curve di calibrazione costruite in base alla specifica procedura analitica adottata [177]. Per il metodo ottimizzato con estrazione SPE, la curva di calibrazione è stata

realizzata su sette punti nell'intervallo compreso tra 5 ng/mL (corrispondente al LOQ) e 1000 ng/mL, intervallo considerato adeguato alla risposta strumentale. I dati ottenuti sono stati elaborati in funzione delle pendenze, delle intercette e dei coefficienti di regressione lineare (R^2). Ciascuna curva è stata definita lineare qualora il valore di R^2 fosse risultato superiore a 0,99.

7.4 Accuratezza e precisione

La riproducibilità della metodica è stata valutata sia in “*intraday*” che in “*interday*”, ossia ciascun controllo di qualità (QC) è stato preparato in triplicato sia durante la stessa sequenza di analisi, sia in giorni diversi. Questa doppia modalità operativa è necessaria per assicurarsi che i risultati delle analisi effettuate non vengano alterati da eventi casuali verificatisi accidentalmente ed anche che essi non siano operatore-dipendenti. La riproducibilità viene studiata in termini di accuratezza e precisione. La precisione, espressa come coefficiente di variazione % (CV%), rappresenta la variabilità dalle aree medie misurate, ovvero il rapporto tra deviazione standard e media matematica di tutte le aree dei picchi di ogni singolo analita analizzate nelle diverse curve di calibrazione. Si ritiene accettabile un valore di CV% che non superi il 15% per tutti i livelli eccetto il LLOQ, dove il limite può essere del 20% [177]. L'accuratezza, espressa come BIAS%, rappresenta la deviazione percentuale del valore misurato rispetto al valore nominale atteso. Essa corrisponde alla media dei valori di accuratezza calcolati per ciascun livello di controllo di qualità (QC) e per ogni analita. Secondo le linee guida, un metodo bioanalitico può essere considerato accurato se i valori medi di accuratezza per ciascun livello QC rientrano entro $\pm 15\%$ rispetto alla concentrazione nominale, mentre per il livello più basso (LLOQ QC) è ammessa una variazione massima di $\pm 20\%$ [177].

7.5 Effetto matrice e recupero

Dal momento che la preparazione del campione prevede l'utilizzo di matrice ematica e successiva iniezione tramite sorgente ESI, un parametro molto importante da valutare durante uno studio è l'effetto matrice. È infatti noto che la sorgente ESI sia molto sensibile alla presenza di possibili interferenti presenti nella matrice che, interferendo con la ionizzazione del campione, potrebbero dare origine a fenomeni di *ion suppression/enhancement* [152, 173]. L'effetto matrice descrive dunque l'influenza che i

componenti della matrice biologica esercitano sull'intensità del segnale dell'analita durante il processo di ionizzazione, potendo determinare una variazione della risposta strumentale rispetto a quella ottenuta in soluzione pura.

$$MF\% = \frac{\text{Area dell'analita in matrice post estrazione}}{\text{Area dell'analita in soluzione pura}} \times 100$$

L'effetto matrice è stato valutato sia per i campioni di sangue intero sia per i campioni DBS, mediante l'aggiunta degli analiti a 3 campioni di acqua dal volume di 50 µL.

Per quanto riguarda i campioni di sangue intero al volume di acqua è stato aggiunto 500 µL di tampone fosfato a pH 6, 50 µL di standard interno e i rispettivi volumi per simulare i tre livelli di concentrazione, corrispondenti a 10 ng/mL, 100 ng/mL e 500 ng/mL.

Per i campioni DBS i 50 µL di acqua sono stati depositati sulle apposite aree del cartoncino preposto. I campioni sono stati quindi lasciati essiccare *overnight*, a temperatura ambiente, a circa 25 °C, e al riparo dalla luce diretta. Successivamente, il cartoncino DBS è stato ritagliato all'interno di una provetta a fondo conico e sono state eseguite le medesime aggiunte dei campioni di sangue intero.

Per tutti e tre i livelli di concentrazione sono state effettuate tre repliche, consentendo così di stimare l'influenza della matrice sul recupero e sulla risposta analitica.

Il recupero (*recovery*) rappresenta l'efficienza con cui l'analita viene estratto dalla matrice biologica attraverso l'intero procedimento di preparazione del campione. Tale parametro consente di quantificare la frazione dell'analita inizialmente presente che viene effettivamente isolata e resa disponibile per l'analisi, includendo tutte le fasi di estrazione e purificazione. Il recupero viene generalmente valutato confrontando le risposte analitiche dei campioni sottoposti all'estrazione completa con quelle di campioni post estrazione, ovvero addizionati con l'analita dopo il completamento della fase estrattiva. La percentuale di recupero viene quindi calcolata mediante la seguente formula [152]:

$$\text{Recupero \%} = \frac{\text{Area del campione estratto}}{\text{Area del campione post estrazione}} \times 100$$

7.6 Effetto di trascinamento

L'effetto di trascinamento (*carry-over*) si verifica quando, a causa delle caratteristiche chimico-fisiche degli analiti, l'eluizione durante la corsa cromatografica risulta

incompleta. Una frazione delle molecole può infatti rimanere adsorbita sulle superfici del sistema cromatografico e venire successivamente rilasciata durante le iniezioni successive. Questo fenomeno genera un segnale spurio nel cromatogramma del campione successivo che può compromettere la specificità e portare a falsi positivi o errori di quantificazione [177]. L'effetto di trascinamento è stato quindi valutato mediante l'iniezione di un campione "bianco" subito dopo il campione contenente lo standard di riferimento alla concentrazione massima della retta di calibrazione (1000 ng/mL per entrambi i metodi).

7.7 Stabilità

La stabilità rappresenta la capacità dell'analita di mantenere inalterata la propria concentrazione e integrità chimica nel tempo, evitando fenomeni di degradazione o variazioni di risposta strumentale che potrebbero compromettere l'affidabilità della quantificazione. Nel presente lavoro, la valutazione della stabilità è stata limitata alla stabilità in *autosampler* a 25 °C, con l'obiettivo di verificare l'assenza di degradazioni significative durante la permanenza dei campioni nel sistema analitico prima dell'iniezione. I controlli di qualità (QC) sono stati analizzati immediatamente dopo la preparazione e, nuovamente, dopo un determinato periodo di permanenza nell'*autosampler*. In accordo con le linee guida, la stabilità è considerata accettabile qualora la variazione della concentrazione misurata rientri entro $\pm 15\%$ rispetto al valore iniziale [177].

8. Risultati e discussione

8.1 Sviluppo e validazione del metodo LC-MS/MS

La metodica è stata sviluppata utilizzando 50 μL di matrice ematica, con l'obiettivo di ottenere risultati analitici affidabili ed efficienti anche in presenza di quantità limitate di campione.

8.1.1 Sensibilità analitica

L'analisi della sensibilità dei due metodi sviluppati (sangue liquido intero e DBS) ha evidenziato differenze significative nei limiti di rilevazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) ottenuti per le molecole oggetto di studio. Per entrambe le metodiche, sono stati ottenuti valori di LOQ inferiori a 5 ng/mL per tutte le molecole considerate, a conferma dell'elevata sensibilità e dell'efficacia complessiva del procedimento analitico. Nella tabella sottostante sono riportati i valori di LOD e LOQ relativi ad Amfetamina, MDMA, MDA e Metamfetamina.

Tabella 4: Valori di LOD e LOQ calcolati per ciascuna molecola analizzata in LC-MS/MS nei campioni di sangue intero

SPE	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Amfetamina	0,28	0,93
MDMA	0,24	0,79
MDA	1,13	3,76
Metamfetamina	0,05	0,16

Tabella 5: Valori di LOD e LOQ calcolati per ciascuna molecola analizzata in LC-MS/MS nei campioni DBS

SPE	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Amfetamina	0,12	0,38
MDMA	0,1	0,35
MDA	0,41	1,35
Metamfetamina	0,06	0,2

Di seguito sono riportati i cromatogrammi relativi al punto 100 ng/mL di ogni molecola in studio, per entrambi i metodi, in modo tale da dimostrare come il processo di ottimizzazione dei parametri strumentali per la loro caratterizzazione fosse avvenuto con successo.

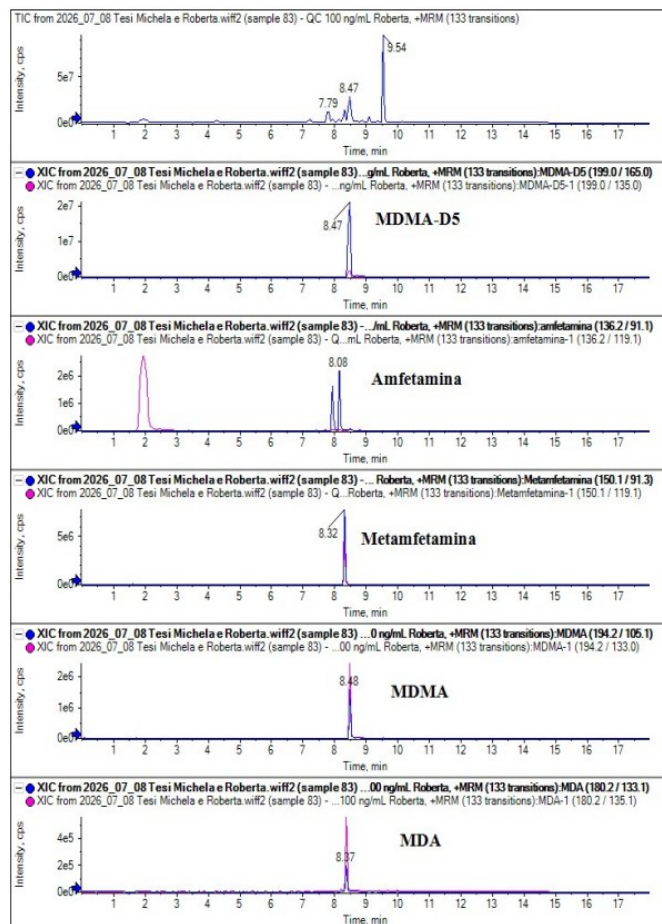


Figura 12: Cromatogrammi relativi ai picchi delle sostanze in esame e dello standard interno (100 ng/mL) in campioni di sangue intero

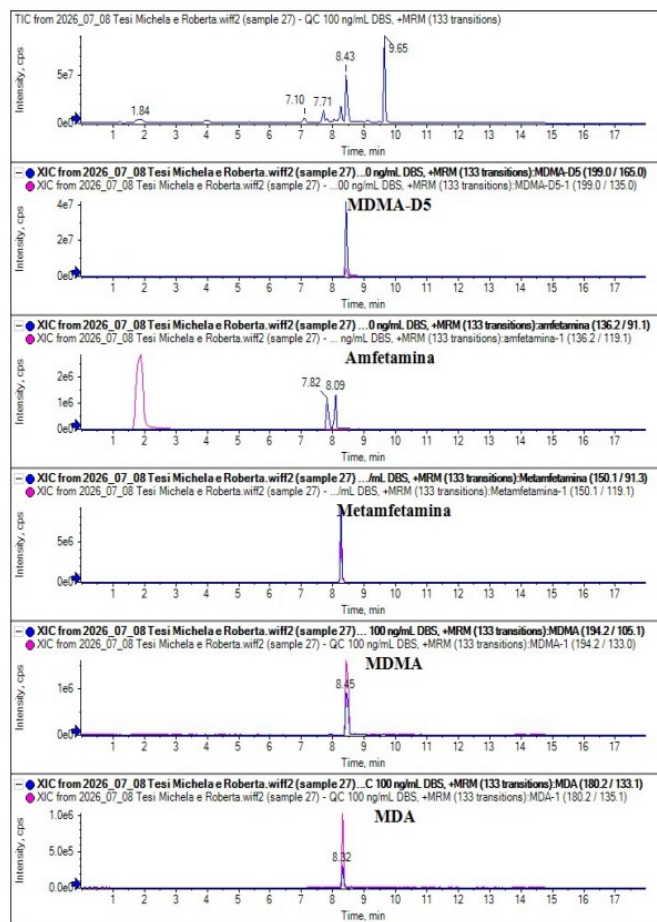


Figura 13: Cromatogrammi relativi ai picchi delle sostanze in esame e dello standard interno (100 ng/mL) in campioni DBS

8.1.2 Linearità, accuratezza e precisione

Le rette di calibrazione ottenute per entrambi i metodi hanno mostrato un'ottima linearità nell'intervallo di concentrazione considerato, con coefficienti di regressione lineare (R^2) superiori a 0,99 per tutte le molecole analizzate e per entrambe le tipologie di campione. In particolare, per l'Amfetamina il valore di R^2 è di 0,997, per l'MDMA è compreso tra 0,996 e 0,998, per l'MDA tra 0,995 e 0,996, mentre per la Metamfetamina tra 0,994 e 0,997.

Tabella 6: Valori di R^2 ottenuti per ciascuna curva di calibrazione

Sostanze	Amfetamina		MDMA		MDA		Metamfetamina	
	Sangue	DBS	Sangue	DBS	Sangue	DBS	Sangue	DBS
Valori di R^2	0,997	0,997	0,998	0,996	0,995	0,996	0,997	0,994

A titolo esemplificativo, si riportano di seguito le curve di calibrazione delle diverse sostanze, ottenute per entrambe le matrici valutate (sangue intero e DBS).

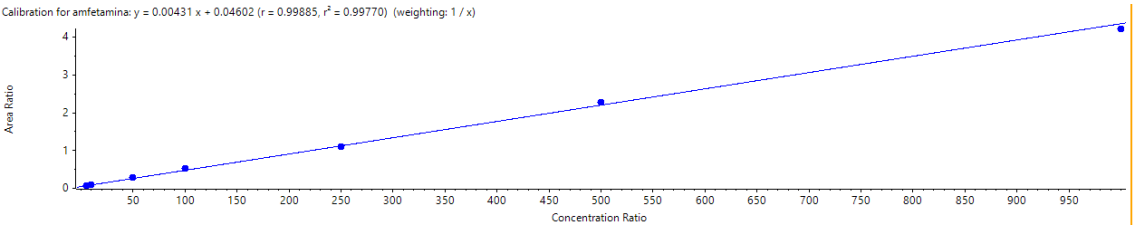


Figura 14: Retta di calibrazione a 7 punti per l'amfetamina nel sangue intero

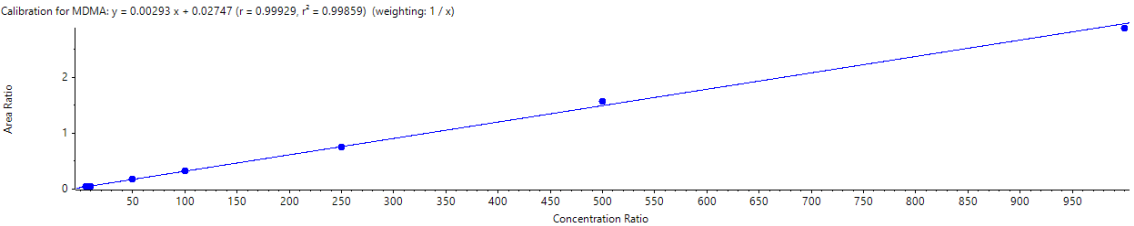


Figura 15: Retta di calibrazione a 7 punti per l'MDMA nel sangue intero

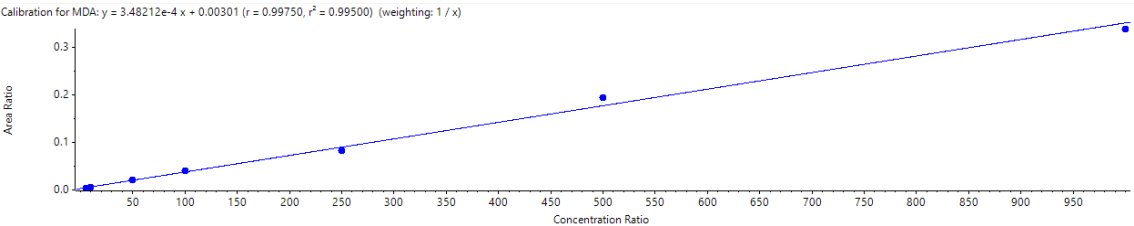


Figura 16: Retta di calibrazione a 7 punti per l'MDA nel sangue intero

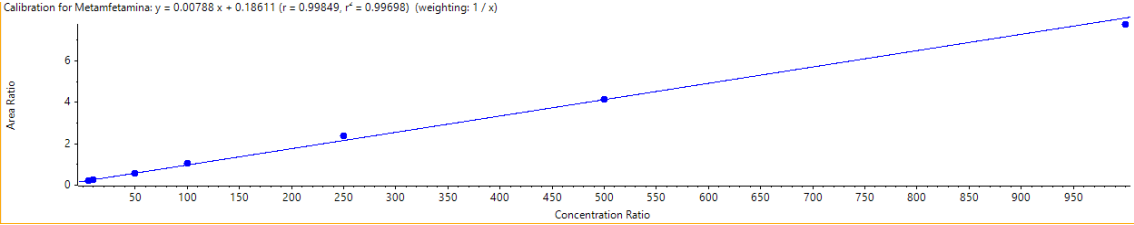


Figura 17: Retta di calibrazione a 7 punti per la metamfetamina nel sangue intero

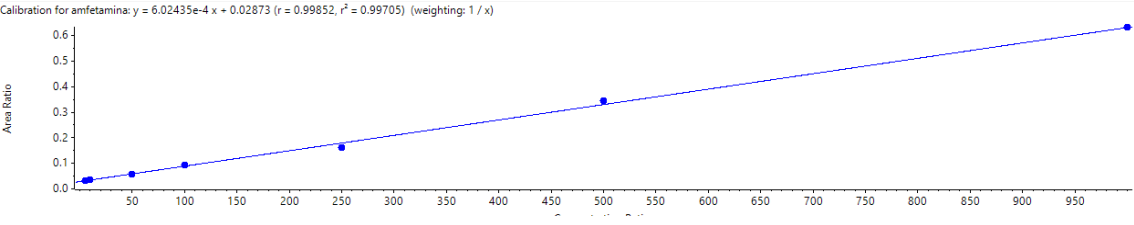


Figura 18: Retta di calibrazione a 7 punti per l'amfetamina in DBS

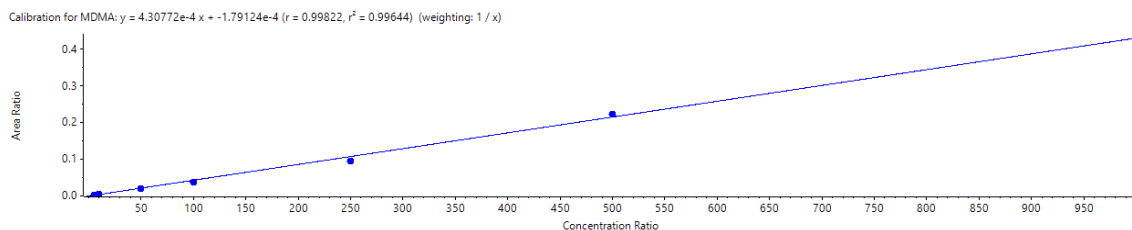


Figura 19: Retta di calibrazione a 7 punti per l'MDMA in DBS

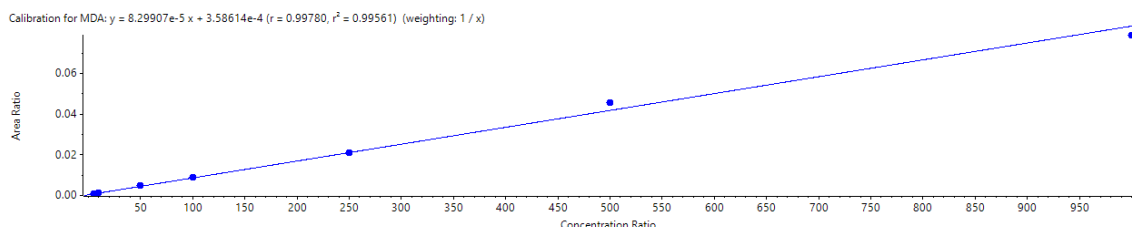


Figura 20: Retta di calibrazione a 7 punti per l'MDA in DBS

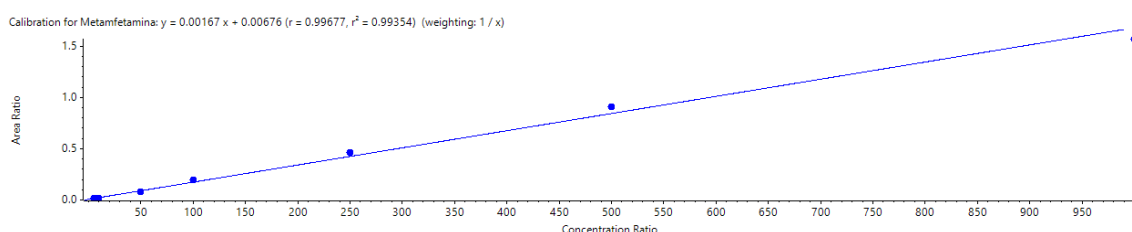


Figura 21: Retta di calibrazione a 7 punti per la metamfetamina in DBS

La ripetibilità *intraday* è stata valutata mediante l'analisi di tre replicati per ciascun livello di QC all'interno dello stesso *batch*. La ripetibilità *interday*, invece, è stata determinata mediante l'elaborazione di tre curve di calibrazione, ciascuna accompagnata dai relativi QC, ottenute in tre giornate analitiche differenti.

Per entrambi i campioni sviluppati mediante SPE, sono stati selezionati tre livelli di QC: 10 ng/mL (*low QC*), 100 ng/mL (*mid QC*) e 500 ng/mL (*high QC*). Questa scelta è motivata dal fatto che il metodo rappresenta un adattamento e un'ottimizzazione di una procedura già validata e utilizzata nell'ambito della routine analitica. Poiché la metodologia originale era già stata validata, è stato possibile ridurre il numero di livelli di QC senza compromettere un controllo adeguato delle prestazioni analitiche. Come è possibile osservare dalla tabella che segue, i valori di BIAS% e CV%, misurati sia all'interno dello stesso *batch* sia tra sessioni analitiche eseguite in giorni differenti, rientrano pienamente nei criteri di accettazione di accuratezza e precisione *intra-* ed *interday*.

Tabella 7: Accuratezza e precisione del metodo per tutte le sostanze analizzate nei campioni di sangue intero

QC 10 ng/mL	Accuratezza (BIAS%)		Precisione (CV%)	
	<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>	<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>
Amfetamina	95,7	77,9	92,5	94,8
MDMA	93,3	83,8	92,8	99,8
MDA	93,3	75,3	99	97,7
Metamfetamina	111,1	87,6	97,1	92,1

QC 100 ng/mL	Accuratezza (BIAS%)		Precisione (CV%)	
	<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>	<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>
Amfetamina	109,4	86,2	96,9	108,6
MDMA	99,7	91,1	98,5	104,1
MDA	111,1	77,9	96,7	102,9
Metamfetamina	113	98,2	98,4	106,1

QC 500 ng/mL	Accuratezza (BIAS%)		Precisione (CV%)	
	<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>	<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>
Amfetamina	108,2	79,9	96,7	105,4
MDMA	113,1	87,4	96,5	106
MDA	113,2	92,2	95,8	106,3
Metamfetamina	97,4	88,5	97,1	107,9

Tabella 8: Accuratezza e precisione del metodo per tutte le sostanze analizzate nei campioni DBS

QC 10 ng/mL	Accuratezza (BIAS%)		Precisione (CV%)	
	<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>	<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>
Amfetamina	101,3	103,3	89,5	92,5
MDMA	98,7	113,4	84,7	88,9
MDA	112,5	102,7	89	93,6
Metamfetamina	94,8	95,1	85,9	88,2

QC 100 ng/mL	Accuratezza (BIAS%)		Precisione (CV%)	
	<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>	<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>
Amfetamina	97,2	98,3	86,5	95
MDMA	91,7	90,9	95,2	92,1
MDA	89,6	97,9	86,2	88,2
Metamfetamina	99,6	88,5	92,8	95,7

QC 500 ng/mL	Accuratezza (BIAS%)		Precisione (CV%)	
	<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>	<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>
Amfetamina	99,8	98,6	85,1	89
MDMA	96,1	107,3	96,7	85,1
MDA	101,4	101,5	94	94,9
Metamfetamina	108,3	104,7	87,6	95,7

8.1.3 Effetto matrice e recupero

Per entrambe le tipologie di campione trattate, le valutazioni dell'effetto matrice e del recupero sono state condotte mediante il metodo SPE. I valori ottenuti per entrambi i parametri si sono dimostrati ottimali per le quattro sostanze in esame, sia su DBS sia su sangue intero. In particolare, l'effetto matrice rientra pienamente nei limiti di accettabilità ($100 \pm 20\%$), pur evidenziando un lieve fenomeno di *ion suppression* per alcuni degli analiti (in particolare Metamfetamina e MDMA), a tutti e tre i livelli di concentrazione e soprattutto nel sangue intero. Più in generale, tale fenomeno risulta evidente per tutte le molecole in studio quando analizzate dopo apposizione su DBS, coerentemente con il fatto che la sorgente di ionizzazione ESI è intrinsecamente più sensibile ai fenomeni di *ion suppression* e *ion enhancement* indotti dalla matrice [152, 173].

Tabella 9: Effetto matrice nei campioni di sangue intero

	Effetto matrice (%)		
	10 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
Amfetamina	87,9	91,5	95,2
MDMA	90,5	89,9	87,1
MDA	103,9	86,2	101,4
Metamfetamina	89,2	88,3	86,2

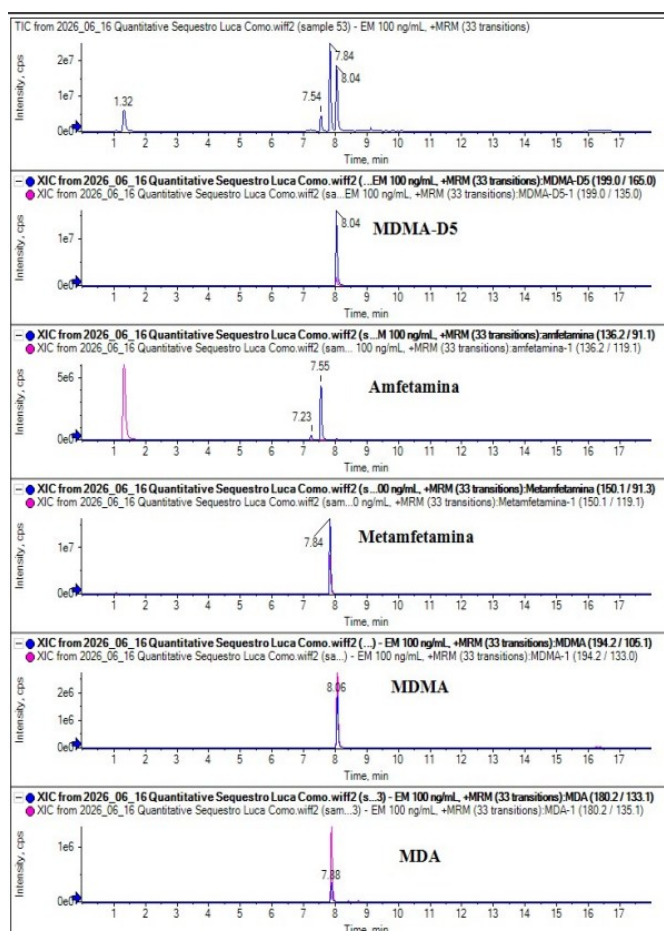


Figura 22: Cromatogrammi relativi all'effetto matrice a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni di sangue intero

Tabella 10: Effetto matrice nei campioni DBS

	Effetto matrice (%)		
	10 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
Amfetamina	82,8	104,9	111,7
MDMA	91,1	117,2	95,4
MDA	110,9	103,0	99,1
Metamfetamina	90,4	109,5	95,8

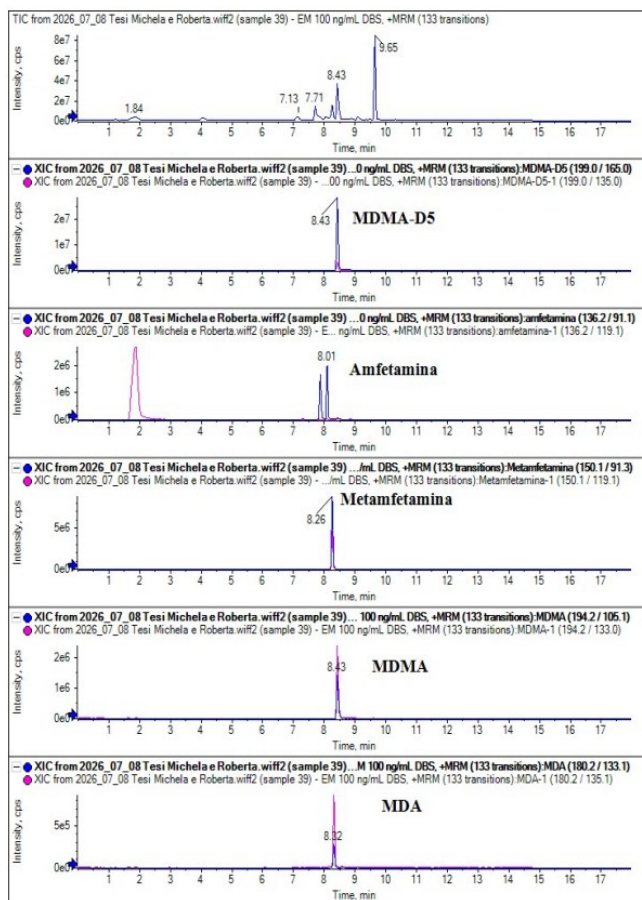


Figura 23: Cromatogrammi relativi all'effetto matrice a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni DBS

Per quanto riguarda il recupero (*recovery*), i valori ottenuti risultano performanti per tutte le molecole.

Tabella 11: Recupero nei campioni di sangue intero

	Recupero (%)		
	10 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
Amfetamina	93,2	90,3	97,3
MDMA	109,5	91,4	89,6
MDA	89,7	100,7	105,4
Metamfetamina	104,5	106,4	89,4

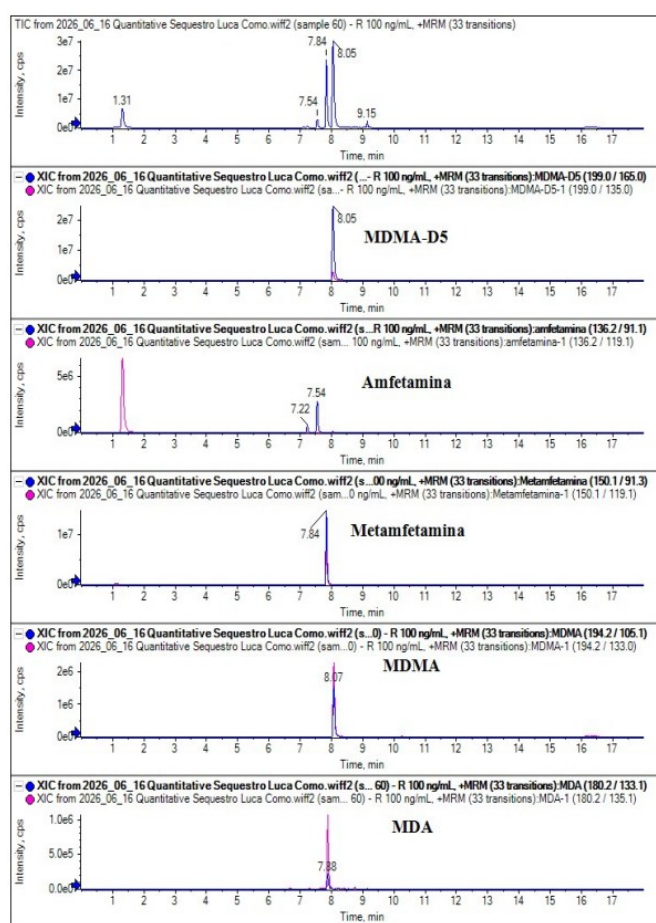


Figura 24: Cromatogrammi relativi al recupero a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni di sangue intero

Tabella 12: Recupero nei campioni DBS

	Recupero (%)		
	10 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
Amfetamina	97,0	93,8	93,9
MDMA	99,1	115,2	94,4
MDA	96,5	88,7	99,6
Metamfetamina	103,1	101,3	107,5

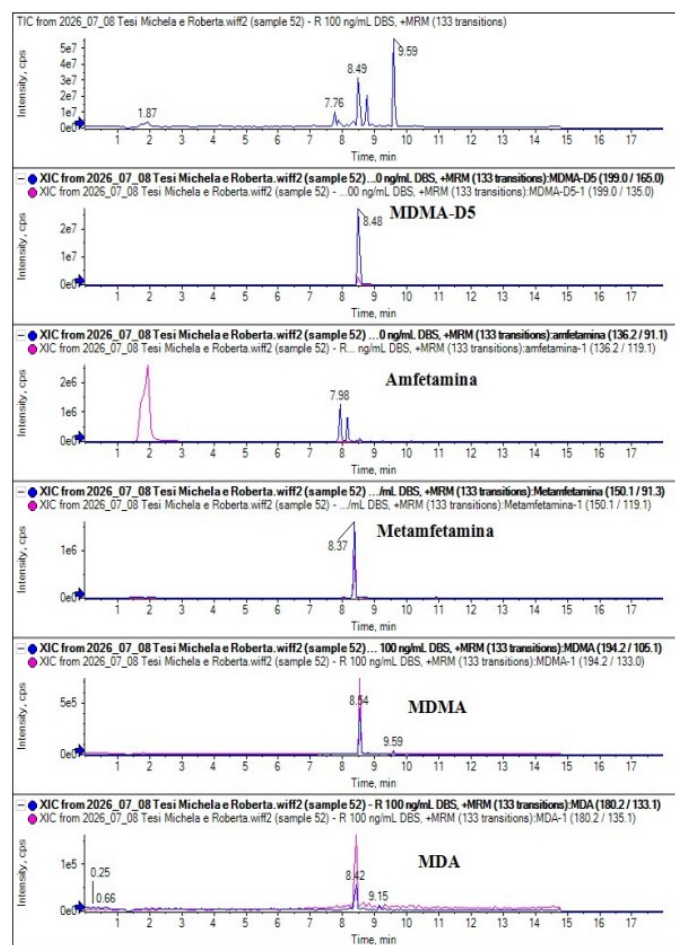


Figura 25: Cromatogrammi relativi al recupero a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni DBS

8.1.4 Effetto di trascinamento

La valutazione dell'eventuale fenomeno di *carry-over* ha confermato l'assenza di effetti di trascinamento per tutte e quattro le sostanze considerate. In particolare, l'analisi dei campioni "bianchi" eseguita dopo l'iniezione del livello più elevato della curva di

calibrazione (1000 ng/mL) non ha evidenziato alcun segnale attribuibile agli analiti, dimostrando che il sistema non presenta contaminazioni tra analisi consecutive.

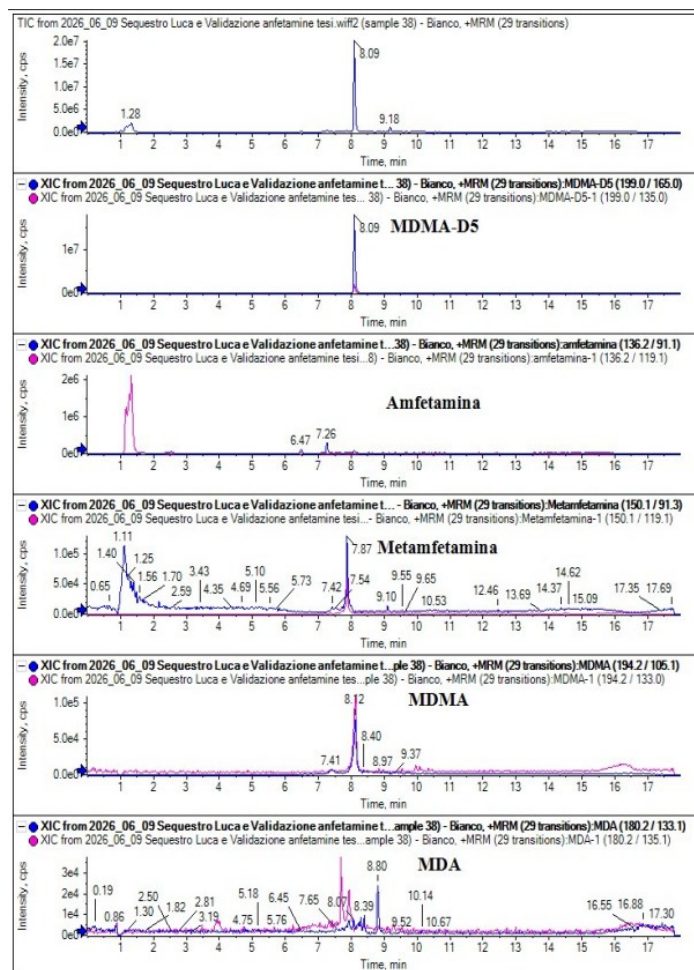


Figura 26: Campioni “bianchi” di sangue intero analizzati dopo il punto più alto della retta (1000 ng/mL)

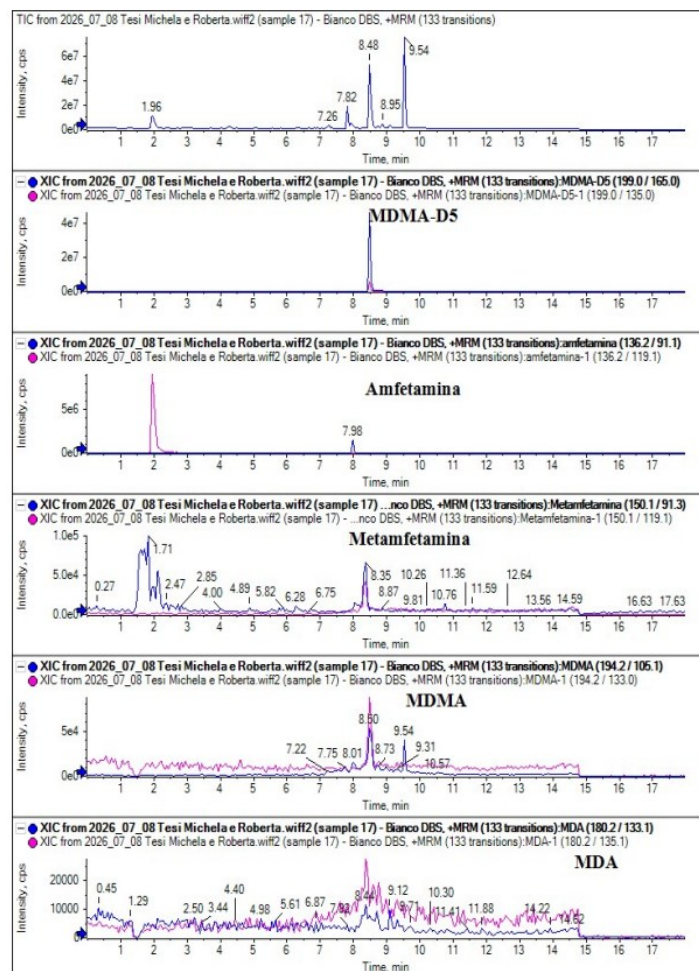


Figura 27: Campioni “bianchi” DBS analizzati dopo il punto più alto della retta (1000 ng/mL)

9. Conclusioni

Lo studio di tesi ha permesso di ottenere risultati del tutto soddisfacenti rispetto agli obiettivi prefissati. In particolare, a seguito di tutti i risultati presentati e discussi nella sezione specifica, è possibile trarre le seguenti conclusioni:

È stata messa a punto una nuova metodica analitica su sistema LC-MS/MS per l'identificazione e la determinazione quantitativa di composti amfetaminici in campioni di sangue intero e DBS. La metodica è risultata del tutto adeguata in termini di sensibilità, specificità, linearità, accuratezza, precisione e selettività, soddisfacendo anche tutti gli ulteriori requisiti richiesti dalle linee guida internazionali relative all'ambito specifico [177]. In particolare, la metodica ha garantito al laboratorio pavese di poter ricercare e identificare queste molecole anche tramite l'utilizzo di un volume esiguo di campione (50 μ L), raggiungendo un'efficienza diagnostica tale per cui in futuro potrà essere testata su campioni reali che, visto lo scarso volume, non hanno permesso un'analisi adeguata.

Infine, lo studio ha permesso di considerare l'utilizzo di un nuovo tipo di colonna cromatografica risultando in un miglioramento della ritenzione e del *peak shape* di queste molecole che non risultava possibile con la colonna precedentemente in uso presso il laboratorio, così da ampliare il *pool* di analisi effettuabili.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Heal DJ et al. Amphetamine, past and present—a pharmacological and clinical perspective. *J Psychopharmacol*. 2013;27:479-496.
- [2] National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. 2012. Amphetamines. In: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012-.
- [3] European Union Drugs Agency (EUDA). *European Drug Report 2026: trends and developments*. Lisbon: EUDA, 2026.
- [4] ESPAD Group. *ESPAD Report 2024: results from the European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs*. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2025.
- [5] Courtney KE, Ray LA. Methamphetamine: an update on epidemiology, pharmacology, clinical phenomenology, and treatment literature. *Drug Alcohol Depend*. 2014;143:11-21.
- [6] Vasan S et al. 2024. Amphetamine toxicity. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2026.
- [7] Angrist B et al. Early pharmacokinetics and clinical effects of oral D-amphetamine in normal subjects. *Biol Psychiatry*. 1987;22:1357-1368.
- [8] Santagati NA et al. Simultaneous determination of amphetamine and one of its metabolites by HPLC with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;30:247-255.
- [9] Brams M et al. Onset of efficacy of long-acting psychostimulants in pediatric attention-deficit/hyperactivity disorder. *Postgrad Med*. 2008;120:69-88.
- [10] Cruickshank CC, Dyer KR. A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction*. 2009;104:1085-1099.
- [11] Nickell JR et al. The vesicular monoamine transporter-2: an important pharmacological target for the discovery of novel therapeutics to treat methamphetamine abuse. *Adv Pharmacol*. 2014;69:71-106.
- [12] Miller GM. The emerging role of trace amine-associated receptor 1 in the functional regulation of monoamine transporters and dopaminergic activity. *J Neurochem*. 2011;116:164-176.
- [13] Martin D, Le JK. 2023. Amphetamine. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2026.
- [14] Franke B et al. The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Mol Psychiatry*. 2012;17:960-987.

- [15] Cortese S. Pharmacologic treatment of attention deficit-hyperactivity disorder. *N Engl J Med*. 2020;383:1050-1056.
- [16] Faraone SV. The pharmacology of amphetamine and methylphenidate: relevance to the neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder and other psychiatric comorbidities. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018;87:255-270.
- [17] Cortese S et al. Comparative efficacy and tolerability of medications for attention-deficit hyperactivity disorder in children, adolescents, and adults: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Psychiatry*. 2018;5:727-738.
- [18] Subcommittee on Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder, Steering Committee on Quality Improvement and Management (American Academy of Pediatrics). ADHD: clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. *Pediatrics*. 2011;128:1007-1022.
- [19] Daughton JM, Kratochvil CJ. Review of ADHD pharmacotherapies: advantages, disadvantages, and clinical pearls. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2009;48:240-248.
- [20] Gautam M, Prabhakar D. Stimulant formulations for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prim Care Companion CNS Disord*. 2018;20(6).
- [21] Kam H, Jeong H. Pharmacogenomic biomarkers and their applications in psychiatry. *Genes (Basel)*. 2020;11:1445.
- [22] U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Table of pharmacogenomic biomarkers in drug labeling*. Silver Spring (MD): FDA. Disponible su: <https://www.fda.gov/drugs/science-and-research-drugs/table-pharmacogenomic-biomarkers-drug-labeling>
- [23] Pisani F et al. Effects of psychotropic drugs on seizure threshold. *Drug Saf*. 2002;25:91-110.
- [24] Kreuzer P et al. Hypothermia associated with antipsychotic drug use: a clinical case series and review of current literature. *J Clin Pharmacol*. 2012;52:1090-1097.
- [25] Shiloh R et al. Association between corneal temperature and mental status of treatment-resistant schizophrenia inpatients. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009;19:654-658.
- [26] Evers SS et al. Olanzapine causes hypothermia, inactivity, a deranged feeding pattern and weight gain in female Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010;97:163-169.
- [27] Ray LA et al. The effects of naltrexone on subjective response to methamphetamine in a clinical sample: a double-blind, placebo-controlled laboratory study. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40:2347-2356.

- [28] Moerke MJ et al. Maintenance on naltrexone+amphetamine decreases cocaine-vs.-food choice in male rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend.* 2017;181:85-93.
- [29] Sulzer D et al. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol.* 2005;75:406-433.
- [30] Cho AK. Ice: a new dosage form of an old drug. *Science.* 1990;249:631-634.
- [31] McKetin R, McLaren J. *The methamphetamine situation in Australia: a review of routine data sources.* NDARC Technical Report No. 172. Sydney: National Drug and Alcohol Research Centre, 2004.
- [32] Topp L et al. The emergence of potent forms of methamphetamine in Sydney, Australia: a case study of the IDRS as a strategic early warning system. *Drug Alcohol Rev.* 2002;21:341-348.
- [33] Cook CE et al. Pharmacokinetics of methamphetamine self-administered to human subjects by smoking S-(+)-methamphetamine hydrochloride. *Drug Metab Dispos.* 1993;21:717-723.
- [34] Schifano F et al. Smokable (“ice”, “crystal meth”) and non smokable amphetamine-type stimulants: clinical pharmacological and epidemiological issues, with special reference to the UK. *Ann Ist Super Sanita.* 2007;43:110-115.
- [35] McKetin R et al. The relationship between crystalline methamphetamine use and methamphetamine dependence. *Drug Alcohol Depend.* 2006;85:198-204.
- [36] Krasnova IN, Cadet JL. Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Res Rev.* 2009;60:379-407.
- [37] Yu S et al. Recent advances in methamphetamine neurotoxicity mechanisms and its molecular pathophysiology. *Behav Neurol.* 2015;2015:103969.
- [38] Kish SJ. Pharmacologic mechanisms of crystal meth. *CMAJ.* 2008;178:1679-1682.
- [39] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). *World Drug Report 2026.* Vienna: United Nations, 2026.
- [40] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). *World Drug Report 2007.* Vienna: United Nations, 2007.
- [41] Volkow ND et al. Distribution and pharmacokinetics of methamphetamine in the human body: clinical implications. *PLoS One.* 2010;5:e15269.
- [42] Lin LY et al. Oxidation of methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6. *Drug Metab Dispos.* 1997;25:1059-1064.
- [43] Halpin LE et al. Neurotoxicity of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Life Sci.* 2014;97:37-44.

- [44] Mark KA et al. High-dose methamphetamine acutely activates the striatonigral pathway to increase striatal glutamate and mediate long-term dopamine toxicity. *J Neurosci*. 2004;24:11449-11456.
- [45] Seiden LS et al. Neurotoxicity in dopamine and 5-hydroxytryptamine terminal fields: a regional analysis in nigrostriatal and mesolimbic projections. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;537:161-172.
- [46] Ferrucci M et al. The effects of amphetamine and methamphetamine on the release of norepinephrine, dopamine and acetylcholine from the brainstem reticular formation. *Front Neuroanat*. 2019;13:48.
- [47] Patel P, Saadabadi A. 2025. Methamphetamine. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2026.
- [48] Simon SL et al. Cognitive performance of current methamphetamine and cocaine abusers. *J Addict Dis*. 2002;21:61-74.
- [49] Johanson CE et al. Cognitive function and nigrostriatal markers in abstinent methamphetamine abusers. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006;185:327-338.
- [50] Callaghan RC et al. Increased risk of Parkinson's disease in individuals hospitalized with conditions related to the use of methamphetamine or other amphetamine-type drugs. *Drug Alcohol Depend*. 2012;120:35-40.
- [51] Callaghan RC et al. Incidence of Parkinson's disease among hospital patients with methamphetamine-use disorders. *Mov Disord*. 2010;25:2333-2339.
- [52] Tong J et al. Is brain gliosis a characteristic of chronic methamphetamine use in the human? *Neurobiol Dis*. 2014;67:107-118.
- [53] Jayanthi S et al. Calcineurin/NFAT-induced up-regulation of the Fas ligand/Fas death pathway is involved in methamphetamine-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:868-873.
- [54] Jeng W et al. Prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation of amphetamines to free radical intermediates that cause CNS regional DNA oxidation and nerve terminal degeneration. *FASEB J*. 2006;20:638-650.
- [55] Yang X et al. Inhibition of ROCK2 expression protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Brain Res*. 2013;1533:16-25.
- [56] Limanaqi F et al. Methamphetamine-induced epigenetic effects and methamphetamine-dependent oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:4982453.
- [57] Perez-Reyes M et al. Clinical effects of daily methamphetamine administration. *Clin Neuropharmacol*. 1991;14:352-358.

- [58] Martin WR et al. Physiologic, subjective, and behavioral effects of amphetamine, methamphetamine, ephedrine, phenmetrazine, and methylphenidate in man. *Clin Pharmacol Ther.* 1971;12:245-258.
- [59] Connell PH. *Amphetamine psychosis*. London: Oxford University Press, 1958.
- [60] Bell DS. The experimental reproduction of amphetamine psychosis. *Arch Gen Psychiatry.* 1973;29:35-40.
- [61] Angrist BM, Gershon S. The phenomenology of experimentally induced amphetamine psychosis—preliminary observations. *Biol Psychiatry.* 1970;2:95-107.
- [62] Riddle EL et al. Mechanisms of methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *AAPS J.* 2006;8:E413-E418.
- [63] Volkow ND et al. Stimulant-induced enhanced sexual desire as a potential contributing factor in HIV transmission. *Am J Psychiatry.* 2007;164:157-160.
- [64] Cohen AL et al. Methamphetamine use and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1707-1713.
- [65] Colovic M, Caccia S. Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;791:337-343.
- [66] Fagan SC et al. Optimal delivery of minocycline to the brain: implication for human studies of acute neuroprotection. *Exp Neurol.* 2004;186:248-251.
- [67] Domercq M, Matute C. Neuroprotection by tetracyclines. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:609-612.
- [68] Yong VW et al. The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol.* 2004;3:744-751.
- [69] Thomas M, Le WD. Minocycline: neuroprotective mechanisms in Parkinson's disease. *Curr Pharm Des.* 2004;10:679-686.
- [70] Zhu S et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature.* 2002;417:74-78.
- [71] Chen M et al. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med.* 2000;6:797-801.
- [72] Wang X et al. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10483-10487.
- [73] Du Y et al. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:14669-14674.

- [74] Zhang L et al. Protective effects of minocycline on behavioral changes and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006;30:1381-1393.
- [75] Moore DJ. Parkin: a multifaceted ubiquitin ligase. *Biochem Soc Trans*. 2006;34:749-753.
- [76] Shimura H et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*. 2000;25:302-305.
- [77] Zhang Y et al. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:13354-13359.
- [78] Buneeva OA, Medvedev AE. Ubiquitin-protein ligase parkin and its role in the development of Parkinson's disease. *Biochemistry (Mosc)*. 2006;71:851-860.
- [79] Schiesling C et al. Review: familial Parkinson's disease—genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008;34:255-271.
- [80] Jiang H et al. Parkin controls dopamine utilization in human midbrain dopaminergic neurons derived from induced pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 2012;3:668.
- [81] Kirik D, Björklund A. Parkinson's disease: viral vector delivery of parkin generates model results in rats. *Gene Ther*. 2005;12:727-729.
- [82] Yang H et al. Mitochondrial dysfunction induced by knockdown of mortalin is rescued by Parkin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;410:114-120.
- [83] Ladenheim B et al. Methamphetamine-induced neurotoxicity is attenuated in transgenic mice with a null mutation for interleukin-6. *Mol Pharmacol*. 2000;58:1247-1256.
- [84] Hozumi H et al. Protective effects of interferon-gamma against methamphetamine-induced neurotoxicity. *Toxicol Lett*. 2008;177:123-129.
- [85] Wen D et al. Cholecystokinin octapeptide induces endogenous opioid-dependent anxiolytic effects in morphine-withdrawal rats. *Neuroscience*. 2014;277:14-25.
- [86] Yang S et al. Effects of cholecystokinin-8 on morphine-induced spatial reference memory impairment in mice. *Behav Brain Res*. 2013;256:346-353.
- [87] Gou HY et al. Protective effects of cholecystokinin-8 on methamphetamine-induced behavioral changes and dopaminergic neurodegeneration in mice. *Behav Brain Res*. 2015;283:87-96.
- [88] Bernschneider-Reif S et al. The origin of MDMA ("ecstasy")—separating the facts from the myth. *Pharmazie*. 2006;61:966-972.
- [89] Hysek CM et al. MDMA enhances emotional empathy and prosocial behavior. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2014;9:1645-1652.

- [90] Rietjens SJ et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): interindividual differences due to polymorphisms and drug-drug interactions. *Crit Rev Toxicol.* 2012;42:854-876.
- [91] de la Torre R et al. Human pharmacology of MDMA: pharmacokinetics, metabolism, and disposition. *Ther Drug Monit.* 2004;26:137-144.
- [92] Kalant H. The pharmacology and toxicology of “ecstasy” (MDMA) and related drugs. *CMAJ.* 2001;165:917-928.
- [93] Schenk S, Highgate Q. Methylenedioxymethamphetamine (MDMA): serotonergic and dopaminergic mechanisms related to its use and misuse. *J Neurochem.* 2021;157:1714-1724.
- [94] Dumont GJ et al. Increased oxytocin concentrations and prosocial feelings in humans after ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine) administration. *Soc Neurosci.* 2009;4:359-366.
- [95] Hysek CM et al. Duloxetine inhibits effects of MDMA (“ecstasy”) in vitro and in humans in a randomized placebo-controlled laboratory study. *PLoS One.* 2012;7:e36476.
- [96] Simmler LD, Liechti ME. Pharmacology of MDMA- and amphetamine-like new psychoactive substances. *Handb Exp Pharmacol.* 2018;252:143-164.
- [97] Naranjo C et al. Evaluation of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) as an adjunct to psychotherapy. *Med Pharmacol Exp Int J Exp Med.* 1967;17:359-364.
- [98] Palamar JJ et al. Trends in reported and biologically confirmed drug use among people who use ecstasy in the nightclub/festival-attending population, 2016-2022. *Drug Alcohol Depend Rep.* 2023;9:100198.
- [99] Shulgin AT. 3-Methoxy-4,5-methylenedioxy amphetamine, a new psychotomimetic agent. *Nature.* 1964;201:1120-1121.
- [100] Stolaroff M. *The secret chief revealed: conversations with Leo Zeff, pioneer in the underground psychedelic therapy movement.* Sarasota (FL): Multidisciplinary Association for Psychedelic Studies, 2004.
- [101] Nichols DE. Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. *J Psychoactive Drugs.* 1986;18:305-313.
- [102] Sessa B. Could MDMA be useful in the treatment of post-traumatic stress disorder? *Prog Neurol Psychiatry.* 2011;15:4-7.
- [103] Nutt DJ et al. Effects of Schedule I drug laws on neuroscience research and treatment innovation. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14:577-585.
- [104] Greer GR, Tolbert R. A method of conducting therapeutic sessions with MDMA. *J Psychoactive Drugs.* 1998;30:371-379.

- [105] Greer G, Tolbert R. Subjective reports of the effects of MDMA in a clinical setting. *J Psychoactive Drugs*. 1986;18:319-327.
- [106] Gasser P. Psycholytic therapy with MDMA and LSD in Switzerland. *Newsletter of the Multidisciplinary Association for Psychedelic Studies (MAPS)*. 1995;5:3-7.
- [107] Doblin R. *Regulation of the medical use of psychedelics and marijuana* [tesi di dottorato]. Cambridge (MA): Harvard University, 2000.
- [108] Farrar AM et al. Ecstasy, molly, MDMA: what health practitioners need to know about this common recreational drug. *Dis Mon*. 2025;71:101851.
- [109] Dunlap LE et al. Dark classics in chemical neuroscience: 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *ACS Chem Neurosci*. 2018;9:2408-2427.
- [110] Vizeli P et al. Ecstasy pharmacogenetics: CYP1A2, CYP2C19, and CYP2B6 polymorphisms moderate MDMA pharmacokinetics in healthy subjects. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2017;27:232-238.
- [111] Schmid Y et al. CYP2D6 function moderates the pharmacokinetics and pharmacodynamics of 3,4-methylene-dioxymethamphetamine in a controlled study in healthy individuals. *Pharmacogenet Genomics*. 2016;26:397-401.
- [112] Pizarro N et al. Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites in human samples including the catechol-type metabolite (3,4-dihydroxymethamphetamine). *Drug Metab Dispos*. 2004;32:1001-1007.
- [113] Steuer AE et al. Impact of cytochrome P450 2D6 function on the chiral blood plasma pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its phase I and II metabolites in humans. *PLoS One*. 2016;11:e0150955.
- [114] Papaseit E et al. Methylone and MDMA pharmacokinetics following controlled administration in humans. *Int J Mol Sci*. 2022;23:14636.
- [115] Verrico CD et al. MDMA (ecstasy) and human dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters: implications for MDMA-induced neurotoxicity and treatment. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007;189:489-503.
- [116] Simmler LD et al. Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br J Pharmacol*. 2013;168:458-470.
- [117] Bogen IL et al. Short- and long-term effects of MDMA (“ecstasy”) on synaptosomal and vesicular uptake of neurotransmitters in vitro and ex vivo. *Neurochem Int*. 2003;43:393-400.
- [118] Rudnick G, Wall SC. The molecular mechanism of “ecstasy” [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:1817-1821.

- [119] Mlinar B, Corradetti R. Endogenous 5-HT, released by MDMA through serotonin transporter- and secretory vesicle-dependent mechanisms, reduces hippocampal excitatory synaptic transmission by preferential activation of 5-HT1B receptors located on CA1 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci*. 2003;18:1559-1571.
- [120] van Wel JH et al. Effects of acute MDMA intoxication on mood and impulsivity: role of the 5-HT2 and 5-HT1 receptors. *PLoS One*. 2012;7:e40187.
- [121] Hysek CM et al. Alpha-adrenergic receptors contribute to the acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in humans. *J Clin Psychopharmacol*. 2013;33:658-666.
- [122] Parrott AC. Oxytocin, cortisol and 3,4-methylenedioxymethamphetamine: neurohormonal aspects of recreational “ecstasy”. *Behav Pharmacol*. 2016;27:649-658.
- [123] Kuypers KPC et al. Multifaceted empathy of healthy volunteers after single doses of MDMA: a pooled sample of placebo-controlled studies. *J Psychopharmacol*. 2017;31:589-598.
- [124] Bershad AK et al. The effects of MDMA on socio-emotional processing: does MDMA differ from other stimulants? *J Psychopharmacol*. 2016;30:1248-1258.
- [125] Dolder PC et al. Direct comparison of the acute subjective, emotional, autonomic, and endocrine effects of MDMA, methylphenidate, and modafinil in healthy subjects. *Psychopharmacology (Berl)*. 2018;235:467-479.
- [126] Hysek CM et al. The norepinephrine transporter inhibitor reboxetine reduces stimulant effects of MDMA (“ecstasy”) in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;90:246-255.
- [127] Rothman RB et al. Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse*. 2001;39:32-41.
- [128] Kirsch P et al. Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans. *J Neurosci*. 2005;25:11489-11493.
- [129] Domes G et al. Oxytocin improves “mind-reading” in humans. *Biol Psychiatry*. 2007;61:731-733.
- [130] McKenna DJ et al. 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA) analogues exhibit differential effects on synaptosomal release of 3H-dopamine and 3H-5-hydroxytryptamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991;38:505-512.
- [131] Sessa B et al. A review of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-assisted psychotherapy. *Front Psychiatry*. 2019;10:138.
- [132] Casey AB, Heifets BD. History, pharmacology and therapeutic mechanisms of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Br J Pharmacol*. 2026;183:3950-3969.

- [133] Graeff FG et al. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996;54:129-141.
- [134] Mueller D et al. Noradrenergic signaling in infralimbic cortex increases cell excitability and strengthens memory for fear extinction. *J Neurosci.* 2008;28:369-375.
- [135] Young MB et al. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine facilitates fear extinction learning. *Transl Psychiatry.* 2015;5:e634.
- [136] Young MB et al. Inhibition of serotonin transporters disrupts the enhancement of fear memory extinction by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Psychopharmacology (Berl).* 2017;234:2883-2895.
- [137] Kamilar-Britt P, Bedi G. The prosocial effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): controlled studies in humans and laboratory animals. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015;57:433-446.
- [138] Carhart-Harris RL et al. The effect of acutely administered MDMA on subjective and BOLD-fMRI responses to favourite and worst autobiographical memories. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;17:527-540.
- [139] Kamboj SK et al. Recreational 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine (MDMA) or “ecstasy” and self-focused compassion: preliminary steps in the development of a therapeutic psychopharmacology of contemplative practices. *J Psychopharmacol.* 2015;29:961-970.
- [140] Sessa B. MDMA and PTSD treatment: “PTSD: from novel pathophysiology to innovative therapeutics”. *Neurosci Lett.* 2017;649:176-180.
- [141] Hysek CM et al. Effects of the α 2-adrenergic agonist clonidine on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in healthy volunteers. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;340:286-294.
- [142] O’Hearn E et al. MDA and MDMA cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity. *J Neurosci.* 1988;8:2788-2803.
- [143] Mahadevarao Premnath S et al. 2026. Physiology, blood plasma. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2026.
- [144] Barbalato L, Pillarisetty LS. 2022. Histology, red blood cell. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2026.
- [145] Thibault L et al. Characterization of blood components prepared from whole-blood donations after a 24-hour hold with the platelet-rich plasma method. *Transfusion.* 2006;46:1292-1299.
- [146] Rasouli M. Basic concepts and practical equations on osmolality: biochemical approach. *Clin Biochem.* 2016;49:936-941.

- [147] Aydoğdu M et al. Liquid-liquid extraction solvent selection for comparing illegal drugs in whole blood and dried blood spot with LC-MS-MS. *J Anal Toxicol.* 2025;49:26-35.
- [148] Flanagan RJ et al. Analytical toxicology: guidelines for sample collection postmortem. *Toxicol Rev.* 2005;24:63-71.
- [149] Abdelaal GMM et al. Postmortem redistribution of drugs: a literature review. *Forensic Sci Med Pathol.* 2024;20:1483-1490.
- [150] Zilg B et al. Postmortem blood sampling—comparison of drug concentrations at different sample sites. *Forensic Sci Int.* 2017;278:296-303.
- [151] Stove CP et al. Dried blood spots in toxicology: from the cradle to the grave? *Crit Rev Toxicol.* 2012;42:230-243.
- [152] Peters FT, Remane D. Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography-mass spectrometry to forensic and clinical toxicology—a review. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403:2155-2172.
- [153] Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics.* 1963;32:338-343.
- [154] Odoardi S et al. Simplifying sample pretreatment: application of dried blood spot (DBS) method to blood samples, including postmortem, for UHPLC-MS/MS analysis of drugs of abuse. *Forensic Sci Int.* 2014;243:61-67.
- [155] Eshghi A et al. Concentration determination of >200 proteins in dried blood spots for biomarker discovery and validation. *Mol Cell Proteomics.* 2020;19:540-553.
- [156] Li W, Tse FL. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed Chromatogr.* 2010;24:49-65.
- [157] Luginbühl M, Gaugler S. The application of fully automated dried blood spot analysis for liquid chromatography-tandem mass spectrometry using the CAMAG DBS-MS 500 autosampler. *Clin Biochem.* 2020;82:33-39.
- [158] Bianchi F et al. MS-based analytical techniques: advances in spray-based methods and EI-LC-MS applications. *J Anal Methods Chem.* 2018;2018:1308167.
- [159] LibreTexts Chemistry. High performance liquid chromatography. In: *Analytical Chemistry – Instrumentation and Analysis* [Internet]. Disponibile su: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography)
- [160] Robards K et al. *Principles and practice of modern chromatographic methods.* London: Academic Press, 1994.

- [161] Alanazi S. Recent advances in liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) applications in biological and applied sciences. *Anal Sci Adv.* 2025;6:e70024.
- [162] Neue UD. *HPLC columns: theory, technology, and practice*. New York (NY): Wiley-VCH, 1997.
- [163] Lindner JM et al. Biphenyl based stationary phases for improved selectivity in complex steroid assays. *J Pharm Biomed Anal.* 2017;142:66-73.
- [164] Cramer H et al. Evaluation of retention and selectivity using biphenyl stationary phases. *LCGC North Am.* 2017;35(6). Disponibile su: <https://www.chromatographyonline.com/view/evaluation-retention-and-selectivity-using-biphenyl-stationary-phases-0>
- [165] Király M et al. [Mass spectrometry: past and present]. *Acta Pharm Hung.* 2016;86:3-11.
- [166] Urban PL. Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2016;374:20150382.
- [167] Haag AM. Mass analyzers and mass spectrometers. *Adv Exp Med Biol.* 2016;919:157-169.
- [168] Olshina MA, Sharon M. Mass spectrometry: a technique of many faces. *Q Rev Biophys.* 2016;49:e18.
- [169] Bantscheff M et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem.* 2007;389:1017-1031.
- [170] Herrmann A et al. Evaluation of a generic multi-analyte method for detection of >100 representative compounds correlated to emergency events in 19 food types by ultrahigh-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2012;1235:115-124.
- [171] Peters FT. Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Clin Biochem.* 2011;44:54-65.
- [172] Malik AK et al. Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *J Chromatogr A.* 2010;1217:4018-4040.
- [173] Gosetti F et al. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2010;1217:3929-3937.
- [174] Zhang NR et al. Quantitation of small molecules using high-resolution accurate mass spectrometers—a different approach for analysis of biological samples. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009;23:1085-1094.
- [175] Sleno L, Volmer DA. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2004;39:1091-1112.

- [176] Qi Y, Volmer DA. Electron-based fragmentation methods in mass spectrometry: an overview. *Mass Spectrom Rev.* 2017;36:4-15.
- [177] European Medicines Agency (EMA). *ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis* (EMA/CHMP/ICH/172948/2019). Amsterdam: EMA, 2022.
- [178] Peters FT et al. Validation of new methods. *Forensic Sci Int.* 2007;165:216-224.