



PRESIDENZA DEL CONSIGLIO DEI MINISTRI
Dipartimento Politiche Antidroga

Progress Report Piano Progetti 2010

I Workshop di presentazione e valutazione dei risultati

Progetto “VulCan”

Valutazione della condizione di vulnerabilità all'uso di *Cannabis* ed allo sviluppo della dipendenza: correlati neuroendocrini e aspetti quali-quantitativi

Responsabile scientifico: Prof. Maria Augusta Raggi

**Centro Collaborativo: Laboratorio di Analisi Farmaco-Tossicologica
Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**Giovedì 11 e Venerdì 12 Novembre 2010
Sala Mercede della Camera dei Deputati**

Progetto “VulCan”

LABORATORIO DI ANALISI FARMACO-TOSSICOLOGICA



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



Responsabile:
PROF. MARIA AUGUSTA RAGGI

Prof. Anna Ferranti
Dott. Roberto Mandrioli
Dott. Laura Mercolini
Dott. Maria A. Saracino
Dott. Francesca Bugamelli
Dott. Chiara Marcheselli
Dott. Emanuele Morganti

Vulnerabilità all'uso di *Cannabis*

L'esposizione ai cannabinoidi nei periodi critici per lo sviluppo cerebrale può incidere su sviluppo e funzionalità dei sistemi di controllo neurotrasmettitoriale dopaminergico e serotoninergico, con ripercussione sugli stati emozionali e comportamentali correlati all'*addiction*

Ottimizzazione di un metodo HPLC-ED per l'analisi di acido omovanillico (HVA, marker di funzionalità del sistema dopaminergico), serotonina (5-HT) e del suo metabolita acido 5-idrossiindolacetico (5-HIAA) (markers del sistema serotoninergico) in **platelet-poor** and **platelet-rich plasma**

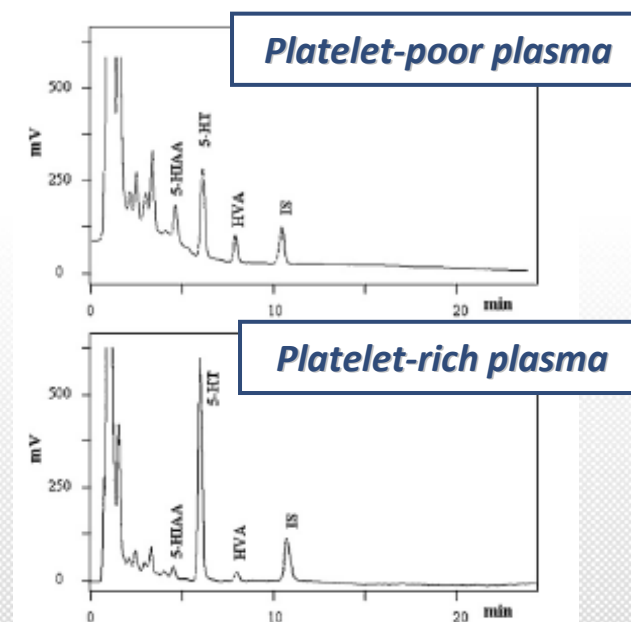
Applicazione a 5 volontari sani (gruppo di controllo):

5-HT libera: 3.9 ng/mL

5-HT totale: 87.5 ng/mL

5-HIAA: 3.9 ng/mL

HVA: 16.2 ng/mL



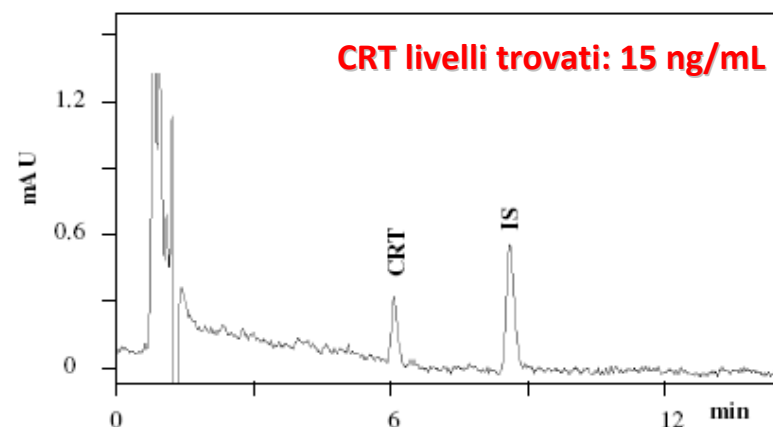
Stress-test: analisi HPLC-DAD di cortisolo (CRT) in saliva

Alterazioni del sistema dello stress (asse ipotalamo-ipofisario) contribuiscono alla vulnerabilità ai cannabinoidi e la sua disregolazione gioca un ruolo chiave nel passaggio dallo stato di abuso a quello di dipendenza

- ❖ Fase stazionaria: colonna a fase inversa pentafluorofenile
- ❖ Fase mobile: ACN/tampone fosfato pH 7.0
- ❖ Raccolta della saliva non stimolata
- ❖ Microestrazione in fase solida impaccata (MEPS)
- ❖ Iniezione nel sistema HPLC-DAD ($\lambda = 240$ nm)

Applicazione a volontari sani (gruppo di controllo)
livelli basali: 0.5 – 10.0 ng/mL

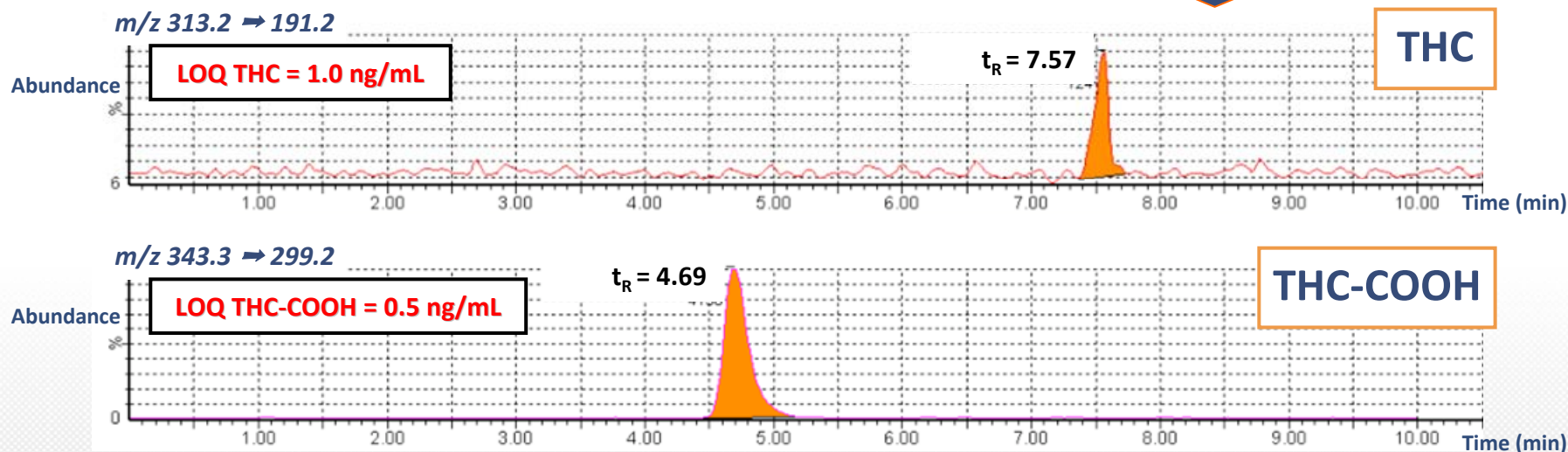
Identificazione e quantificazione
di CRT (soggetto sotto stress)
in 500 μ L di saliva



Analisi LC-MS/MS di cannabinoidi in DBS di abuser di *Cannabis*

- ❖ Fase stazionaria: colonna a fase inversa C8 + precolonna C8
- ❖ Fase mobile: 0.1% ac. formico in ACN/0.1% ac. formico in H₂O
- ❖ Spettrometro di massa: elettrospray – triplo quadrupolo
- ❖ Standard interni: THC-d₃, THC-COOH-d₃

Identificazione e quantificazione
di THC e THC-COOH
in 1 goccia di sangue



Goccia di sangue = macchia di sangue
essiccato
(Dried Blood Spots, DBS)



Vantaggi rispetto al prelievo di sangue classico:

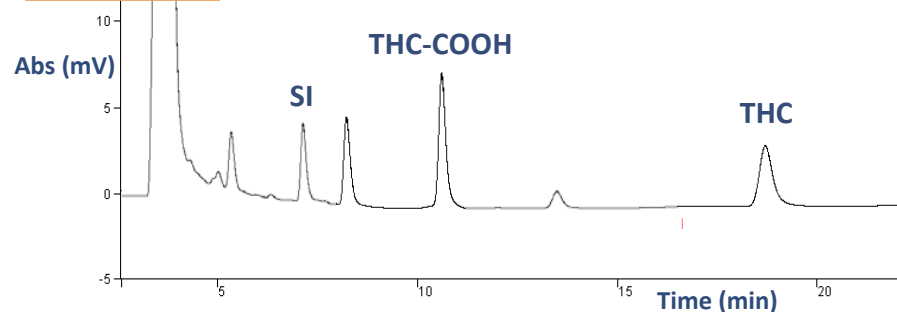
- ❖ minima invasività del campionamento
- ❖ minori volumi ematici impiegati
- ❖ facilità di stoccaggio e trasporto
- ❖ minore rischio biologico per l'operatore
- ❖ costi inferiori

Analisi HPLC-UV/F di cannabinoidi in capelli e saliva di abuser di *Cannabis*

- ❖ Fase stazionaria: colonna a fase inversa C18 + precolonna C18
- ❖ Fase mobile: ACN/tampone fosfato (pH 2.7)
- ❖ Detector UV: $\lambda = 220 \text{ nm}$;
- ❖ Detector F: $\lambda_{\text{ecc}} = 220 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 305 \text{ nm}$

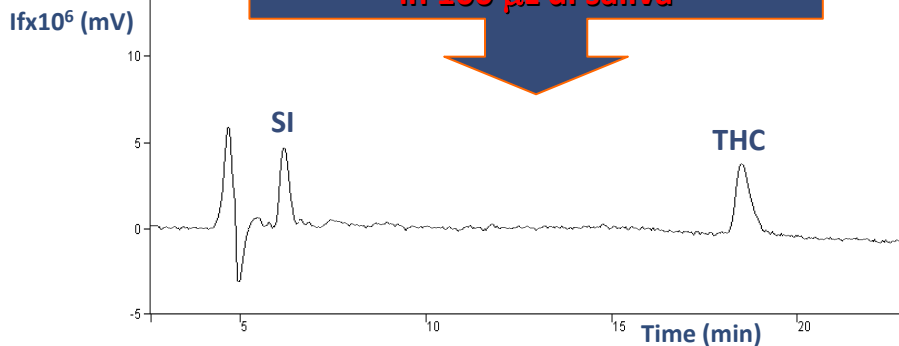
Identificazione e quantificazione
di cannabinoidi
in 5 mg di capelli

HPLC-UV

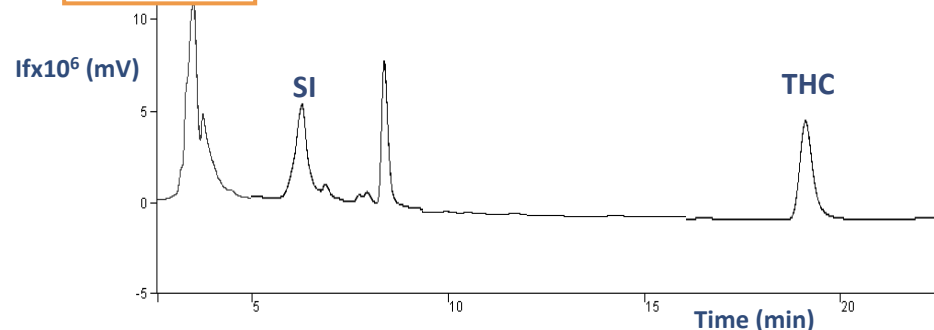


HPLC-F

Identificazione e quantificazione
di cannabinoidi
in 100 μL di saliva



HPLC-F



Sensibilità del metodo:

LOQ THC = 10 ng/mL

LOQ THC-COOH = 5 ng/mL

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE 9 marzo - 8 novembre 2010

Pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali e in volume:

1. L. Mercolini, R. Mandrioli, G. Gerra, M.A. Raggi, Analysis of cocaine and two metabolites in dried blood spots by liquid chromatography with fluorescence detection: a novel test for cocaine and alcohol intake. *Journal of Chromatography A*, 217, 7242-7248 (2010)
2. L. Somaini, M.A. Raggi, C. Donnini, M.A. Saracino, M. Manfredini, M.L. Gerra, M. Amore, G. Serpelloni, G. Gerra, Vulnerabilità all'abuso di sostanze psicotrope: Esperienze Infantili Avverse (EIA), polimorfismi genetici e correlati neuroendocrini. In: "Elementi di Neuroscienze e Dipendenze. Manuale per gli operatori dei Dipartimenti delle Dipendenze". A cura di G. Serpelloni, F. Bricolo, M. Gomma. 2a Ed. Giugno 2010, pp. 241-248

Comunicazioni a congresso:

10° Sigma-Aldrich Young Chemists Symposium (SAYCS), Pesaro, 18-20 Ottobre 2010

1. L. Mercolini, M.A. Raggi, Analisi di cocaina e alcool, basta una goccia di sangue? (*comunicazione orale*).
2. L. Mercolini, R. Mandrioli, F. Desiato, C. Marcheselli, M.A. Raggi, Metodo ad elevata sensibilità per l'analisi di amfetamine in DBS.
3. L. Mercolini, R. Mandrioli, F. Manco, G. Gerra, G. Serpelloni, M.A. Raggi, Vulnerabilità all'uso di *Cannabis*: un metodo LC-UV/F per il monitoraggio di cannabinoidi nei capelli.
4. L. Mercolini, R. Mandrioli, D. Giocondi, G. Serpelloni, M.A. Raggi, *Cannabis*: test sulla saliva di *drivers* sotto l'effetto di sostanze psicotrope.
5. L. Mercolini, R. Mandrioli, V. Sorella, D. Giocondi, G. Serpelloni, M.A. Raggi, Analisi HPLC-F di cannabinoidi in DBS per il controllo su strada.
6. L. Mercolini, M. Melis, E. Varesio, Gérard Hopfgartner, M. A. Raggi, Valutazione della stabilità di sostanze d'abuso in dried blood spots mediante HPLC-F.

Convegno "Le tecniche di analisi nelle scienze forensi: limiti e potenzialità", Imola, 11 giugno 2010

7. R. Mandrioli, L. Mercolini, M.A. Saracino, C. Marcheselli, M.A. Raggi, Matrici biologiche alternative per l'analisi forense di sostanze psicotrope: capelli e saliva.

Comunicazioni a congresso:

Pharmacovigilance and Therapeutic Drug Monitoring: Quo Vadis? IX International Meeting of the TDM Task Force of AGNP, Bolzano, September 2-4, 2010

8. L. Mercolini, R. Mandrioli, G. Gerra, G. Serpelloni, M.A. Raggi, Original HPLC-F method for the simultaneous determination of cocaine and two metabolites in dried blood spots and plasma.

XX National Meeting on Medicinal Chemistry (NMMC), Abano Terme, September 12-16, 2010

9. L. Mercolini, R. Mandrioli, M.C. Pieri, G. Gerra, M.A. Raggi, Simultaneous determination of 5-hydroxytryptamine (serotonin) and its main metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) by HPLC-F.

INIZIATIVE DI FORMAZIONE, INFORMAZIONE E DIVULGAZIONE

❖ ***Istituto Commerciale "Ginanni", Ravenna, 4 maggio 2010***

Giornata d'informazione "ROAD SAFETY IS NO ACCIDENT" - I giovani utenti della strada.

Seminario "Guida e comportamenti a rischio", Prof. M.A. Raggi

❖ ***Alma Mater Studiorum - Università di Bologna***

- Seminario "Gli effetti delle sostanze di abuso: aspetti neurobiologici e clinici".

Dott. Lorenzo Somaini, Direttore Ser.T. Cossato (BI)

- Seminario "Sinistrosità stradale ed uso di sostanze alcoliche e stupefacenti"

Dott. Daniele Giocondi, Comandante Polizia Stradale, Bologna

- Seminario "SOSTANZE D'ABUSO E DIPENDENZA": "Analisi LC-MS/MS di sostanze d'abuso in plasma e dried blood spots (DBS)", **Dott. Laura Mercolini (assegnista progetto VulCan);**

"Analisi HPLC-ED di marker neuroendocrini coinvolti nelle tossicodipendenze", **Dott. Maria A. Saracino**

“CHIMICA E SOCIETÀ, IL RUOLO DELL'ANALISI TOSSICOLOGICA NELLA LOTTA AGLI INCIDENTI STRADALI”

**Sessione organizzata e presieduta dalla Prof. Maria Augusta Raggi
nell'ambito del X SAYCS-Sigma-Aldrich Young Chemists Symposium
(Pesaro, 18-20 ottobre 2010)**

❖ **Comandante Daniele Giocondi** (*Dirigente Polizia Stradale di Bologna*)

Sinistrosità stradale ed uso di sostanze alcoliche e stupefacenti

❖ **Dott. Giordano Biserni** (*Presidente ASAPS*)

UE 2000-2010: obbiettivo -50% di incidenti avvicinato ma non raggiunto. Il nuovo codice della strada sarà la svolta decisiva?

❖ **Prof. Veniero Gambaro** (*Università degli Studi di Milano*)

L'apporto della chimica tossicologica forense all'applicazione degli art. 186 e 187 del Codice della Strada

❖ **Dott. Laura Mercolini** (*Università di Bologna, assegnista Progetto VulCan*)

Analisi di cocaina e alcool, basta una goccia di sangue?

❖ **Dott. Matteo Conti** (*AUSL Ravenna, Area Vasta Romagna*)

Profilo metabolico urinario completo dei cannabinoidi e loro isomeri mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione

**In questa occasione la Prof. Maria Augusta Raggi e la Dott. Laura Mercolini
sono state premiate con due medaglie d'argento dalla Società Chimica Italiana (SCI)**

CONCLUSIONI

- ❖ In accordo con quanto previsto dal **Progetto VulCan**, i metodi analitici sviluppati sono stati applicati a campioni "bianchi" (provenienti da volontari sani), *spiked* con gli analiti, e ad alcuni campioni "reali" di abuser.
- ❖ I risultati finora ottenuti sono da noi ritenuti soddisfacenti ed in linea con quanto programmato.

Work in progress:

Nei prossimi mesi si procederà all'applicazione sistematica delle metodiche a campioni provenienti da abuser di *Cannabis* e soggetti "a rischio", soprattutto in collaborazione con il Ser.T di Cossato (Dott. L. Somaini) e con l'Università di Parma (Prof. C. Donnini).