

L'IDENTIFICAZIONE ANALITICA DELLE NUOVE SOSTANZE PSICOATTIVE

Uno dei problemi principali legati alla diffusione delle Nuove Sostanze Psicoattive (NSP) è legato alla difficoltà del loro riconoscimento analitico, sia in campioni provenienti da reperti, sia in campioni biologici prelevati in casi di intossicazione acuta potenzialmente correlati al loro consumo.

Difficoltà di riconoscimento analitico delle NSP

Dal 2009, nonostante tale difficoltà, attraverso il network dei Centri Collaborativi, il Sistema Nazionale di Allerta Precoce (National Early Warning System - N.E.W.S.) del Dipartimento Politiche Antidroga ha potuto raccogliere numerose informazioni analitiche sulle NSP ad esso segnalate (informazioni generalmente non disponibili dalla letteratura scientifica ufficiale) e ha potuto quindi disseminarle per aumentare la capacità di identificazione analitica da parte dei laboratori che collaborano con il Sistema di Allerta.

Disseminazione delle informazioni analitiche nel network N.E.W.S.

Le informazioni analitiche sono rappresentate da dati utili all'identificazione di una molecola, ottenuti attraverso l'uso di diverse tecniche, la cui scelta dipende sia dalla loro disponibilità presso i vari laboratori, sia dal tipo di analisi necessaria per risolvere un determinato problema analitico. Diverse sono le tecniche strumentali utilizzabili e utilizzate per l'identificazione e qualificazione delle NSP e di seguito si riporta una breve descrizione delle tecniche a più ampia diffusione.

Diverse tecniche di identificazione

Le tecniche principalmente utilizzate sono tecniche cromatografiche - cromatografia liquida (LC) o gas cromatografia (GC) - che consentono la separazione delle componenti chimiche presenti nel campione sottoposto ad analisi. Tali tecniche sono accoppiate a metodi cosiddetti di rivelazione, che consentono cioè di identificare ogni singolo componente della miscela: la spettrometria di massa o in alcuni casi il FID (Flame Ionization Detector, il rivelatore a ionizzazione di fiamma), o l'UV-Vis.

Le tecniche cromatografiche

La Gas Cromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa (GC-MS), rappresenta la tecnica più comunemente utilizzata per l'identificazione di molecole di interesse forense. Si avvale dell'unione della tecnica gascromatografica, che ha elevato potere separativo e sensibilità, accoppiata alla specificità analitica delle tecniche in spettrometria di massa (MS). Pertanto fornisce spettri specifici per ogni singola molecola presente in una miscela complessa, senza la necessità di separare a priori, i singoli componenti. La GC-MS, specie nel caso delle NSP, viene usata essenzialmente per l'analisi qualitativa. Alcuni laboratori affiancano a questa, la GC-FID, per l'analisi quantitativa. Tuttavia, date le basse concentrazioni generalmente presenti in campioni biologici, nonché la frequente contemporanea presenza di più NSP in uno stesso prodotto o reperto, è necessario utilizzare tecniche più sensibili e selettive come la LC-MS o l'LC-MS/MS.

GC-MS

LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry), combina le caratteristiche separative dell'HPLC con la spettrometria di massa tandem, aumentando notevolmente la selettività e riducendo le interferenze tra gli analiti e la matrice nella quale si trovano.

LC-MS/MS

Un avanzamento delle tecniche HPLC è costituito dall'UPLC, Ultra High Performance Liquid Chromatography, un sistema in cromatografia ad ultraprestazione che consente di aumentare l'efficienza separativa in tempi di analisi molto ridotti, così come di ridurre i volumi di solvente necessari.

UPLC

L'attività di riconoscimento e caratterizzazione delle NSP da parte dei Centri Collaborativi del Sistema ha stimolato, negli ultimi anni, alcune linee di ricerca che hanno condotto laboratori chimico-tossicologici ad utilizzare tecniche sempre più sofisticate e alla messa a

HRMS, MS/MS, LC-QTOF, MALDI-TOF-MS

punto di metodi dedicati a vantaggio dell'accuratezza, precisione e sensibilità dell'analisi, migliorando la qualità del dato analitico. Tra queste tecniche ricordiamo la spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS), che attraverso misure di massa accurata consente di determinare la precisa formula elementare di una molecola e di risalire alla sua identità attraverso match di libreria; l'LC-QTOF-MS; il MALDI-TOF-MS; l'elettroforesi capillare.

Il riconoscimento analitico è possibile (o auspicabile) tramite l'utilizzo di standard analitici certificati, tramite confronto di uno spettro "incognito" con spettri da libreria (library-match) o spettri forniti da altre fonti, incluse le informazioni diffuse dal Sistema di Allerta, così come la quantificazione è possibile attraverso la realizzazione di curve di calibrazione, con standard analitici. Alcuni database online forniscono librerie di spettri di massa per assistere il lavoro dei laboratori nell'identificazione delle molecole e per offrire una piattaforma di scambio delle informazioni tra laboratori (NIST, Agilent, SWGDrug). Tali librerie vengono aggiornate mano a mano che gli standard analitici delle nuove sostanze psicoattive vengono prodotti e resi disponibili.

Riconoscimento per confronto

Gli standard analitici di riferimento sono certificati come di elevata qualità e purezza, e sono disponibili presso ditte specializzate in reagenti per la ricerca, purtroppo la loro disponibilità è limitata e spesso inesistente proprio perché il mercato delle NSP è estremamente dinamico e sempre nuove molecole vengono messe in circolazione.

Standard analitici

In alcuni casi, i laboratori partner del Sistema Nazionale di Allerta Precoce hanno utilizzato come riferimento i prodotti provenienti da sequestro. Tali standard, tuttavia, non sono certificati. In molti, casi anche gli spettri prodotti non sono stati validati e ciò rappresenta una criticità. Tuttavia, tale modalità operativa rappresenta anche l'unica opportunità per i laboratori di riuscire nell'identificazione e caratterizzazione di un campione incognito e far luce sul fenomeno delle NSP che circolano sul territorio in uno specifico arco temporale.

Alcuni laboratori del network, grazie anche a collaborazioni con Università o enti privati, hanno reso disponibile la completa caratterizzazione della struttura chimica delle molecole da loro individuate, con tecniche NMR (risonanza magnetica nucleare) sia del protone che del carbonio ($^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$), in alcuni casi accompagnati anche da esperimenti bidimensionali in NMR come il COESY, TOCSY, NOESY, HSQB, HMBC, che forniscono ulteriori prove a supporto dell'elucidazione della struttura chimica.

NMR

Infine, tra le altre tecniche utilizzate, è da citare la spettroscopia infrarossa (FTIR), che fornisce una sorta di impronta digitale della molecola, ma che è possibile utilizzare solamente per campioni piuttosto concentrati e ad elevata purezza.

FTIR

Anche l'aspetto fisico ha una sua rilevanza nell'identificazione di una nuova sostanza psicoattiva.

Aspetto fisico

L'esame dell'aspetto, del confezionamento, eventuali etichette presenti, la formulazione utilizzata, loghi e colori possono fornire informazioni utili durante un'indagine e indicazioni per il personale di laboratorio su cosa "cercare". Miscele vegetali etichettate come profumatori ambientali sono risultati contenere cannabinoidi sintetici. Polveri o capsule etichettate come fertilizzanti per piante o bonsai, o sali da bagno, sono risultati contenere catinoni sintetici, compresse con loghi e colori analoghi all'ecstasy, contenevano in realtà piperazine o altre droghe stimolanti.

BIBLIOGRAFIA

- UNODC 2013. The challenge of new psychoactive substances. A Report from the Global SMART Programme.
- UNODC, 2013. Recommended methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists in Seized Materials.
- Favretto D, Pascali JP, Tagliaro F. New challenges and innovation in forensic toxicology: focus on the "New Psychoactive Substances". *J Chromatogr A*. 2013 Apr 26;1287:84-95. doi: 10.1016/j.chroma.2012.12.049. Epub 2012 Dec 29.
- Elisabetta Bertol, Renata Borriello, Marina Caligara, Donata Favretto, Roberto Gagliano Candela, Cristiana Stramesi, Elisa Saligari, Sabina Strano Rossi, Marcello Chiarotti, Francesco Mari. Linee Guida indirizzate alle Strutture dotate di Laboratori per gli accertamenti di sostanze d'abuso con finalità tossicologico-forensi e medicolegali su campioni biologici prelevati da vivente. *Italian Journal on Addiction*. Vol. 2 Numero 5-6, 2012.
- GTFI. Linee Guida per Strutture dotate di Laboratori per gli accertamenti di Sostanze d'Abuso con Finalità Tossicologico-Forensi e Medico-Legali. Revisione n. 4 del 6 dicembre 2012.
- Gregori A, Damiano F, Bonavia M, Mileo V, Varani F, Monfreda M. Identification of two cannabimimetic compounds WIN48098 and AM679 in illegal products. *Sci Justice*. 2013 Sep;53(3):286-92. doi: 10.1016/j.scijus.2012.10.002. Epub 2012 Nov 9.
- Zamengo L, Frison G, Gregio M, Orrù G, Sciarrone R. Determination of illicit drugs in seized materials: role of sampling and analysis in estimation of measurement uncertainty. *Forensic Sci Int*. 2011 May 20;208(1-3):108-23. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.11.018. Epub 2010 Dec 15.
- Gottardo R, Chiarini A, Dal Prà I, Seri C, Rimondo C, Serpelloni G, Armato U, Tagliaro F. Direct screening of herbal blends for new synthetic cannabinoids by MALDI-TOF MS. *J Mass Spectrom*. 2012 Jan;47(1):141-6. doi: 10.1002/jms.2036.
- Pascali JP, Bortolotti F, Tagliaro F. Recent advances in the application of CE to forensic sciences, an update over years 2009-2011. *Electrophoresis*. 2012 Jan;33(1):117-26. doi: 10.1002/elps.201100463.
- Strano-Rossi S, Anzillotti L, Castrignanò E, Romolo FS, Chiarotti M. Ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, "spice" and stimulants in oral fluid. *J Chromatogr A*. 2012 Oct 5;1258:37-42. doi: 10.1016/j.chroma.2012.07.098. Epub 2012 Aug 13.
- Merola G, Aturki Z, D'Orazio G, Gottardo R, Macchia T, Tagliaro F, Fanali S. Analysis of synthetic cannabinoids in herbal blends by means of nano-liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 2012 Dec;71:45-53. doi: 10.1016/j.jpba.2012.08.008. Epub 2012 Aug 16.
- Valoti E, Casagni E, Dell'Acqua L, Pallavicini M, Roda G, Rusconi C, Straniero V, Gambaro V. Identification of 1-butyl-3-(1-(4-methyl)naphtoyl)indole detected for the first time in "herbal high" products on the Italian market. *Forensic Sci Int*. 2012 Nov 30;223(1-3):e42-6. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.08.009. Epub 2012 Aug 29.
- Vincenti M, Salomone A, Gerace E, Pirro V. Role of LC-MS/MS in hair testing for the determination of common drugs of abuse and other psychoactive drugs. *Bioanalysis*. 2013 Aug;5(15):1919-38. doi: 10.4155/bio.13.132.

