

# LM Biotecnologie avanzate

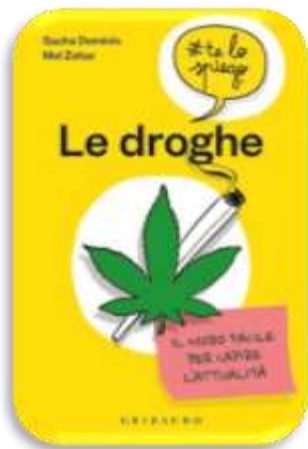
Metodologie analitiche per le biotecnologie



**TECNICHE CROMATOGRAFICHE ACCOPPIATE ALLA  
SPETTROMETRIA DI MASSA**

**Sostanze Psicoattive**

Prof. Manuel Sergi  
Dip. di Chimica  
Sapienza Università di Roma  
[manuel.sergiuniroma1.it](mailto:manuel.sergiuniroma1.it)



## Che cosa è la droga?

Le droghe sono sostanze chimiche o derivate da piante che possono causare alterazioni fisiche, mentali ed emotive.

Sostanze che modificano sensazioni e comportamento

**Droga:** pianta o parte di pianta impiegata dopo essere stata opportunamente trattata.

Nel linguaggio corrente viene chiamata d. qualsiasi **sostanza** capace di modificare temporaneamente lo stato di coscienza o comunque lo stato psichico dell'individuo; rientrano pertanto fra le d. gli stupefacenti, gli allucinogeni, i barbiturici e gli altri psicostimolanti, nonché alcune sostanze atte ad aumentare le energie e il rendimento fisico, soprattutto nelle competizioni sportive. In tale quadro il termine d. è molto generico poiché comprende sostanze con proprietà diversissime e spesso indica in **senso** restrittivo composti esclusi per legge dal prontuario farmaceutico quali l'eroina, la **cocaína**, l'LSD. Solitamente si fa distinzione tra *d. leggere* e *d. pesanti* (oppure, per traduzione dell'ingl. hard e soft, tra d. dure e d. morbide), distinzione fondata soprattutto sulla considerazione dei danni che le varie d. possono produrre sull'organismo di chi ne fa uso, e sulla condizione di **dipendenza** che esse tendono a indurre.



“Sono da considerarsi sostanze stupefacenti tutte quelle sostanze di origine naturale o sintetica che, agendo sul sistema nervoso centrale, provocano stati di dipendenza fisica e/o psichica, dando luogo a stati di tolleranza (bisogno di aumentare le dosi con l'aumento dell'abuso) ed in alcuni casi di dipendenza a doppio filo e cioè dipendenza dello stesso da più droghe”



# Classificazione

Criterio di preparazione



Criterio sintomatologico

Criterio legale







## **Testo Unico DPR 309/90 e successive *modificazioni***

(ultimo aggiornamento all'atto pubblicato il 27/12/2023)

Testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza



### **Tabella I**

**Oppio e derivati oppiacei (morfina, eroina, metadone ecc.)**

**Foglie di Coca e derivati**

**Amfetamina e derivati amfetaminici (ecstasy e designer drugs)**

**Allucinogeni (dietilammide dell'acido lisergico - LSD, mescalina, psilocibina, fenciclidina, ketamina , ecc.)**

**Tabella II  
Cannabis**

**Tabella III  
Barbiturici**

**Tabella IV  
Benzodiazepine**

### **Tabella dei medicinali**

**Nella Tabella dei medicinali sono inserite le sostanze attive che hanno attività farmacologica e pertanto sono usate in terapia e le relative preparazioni farmaceutiche. La tabella è suddivisa in cinque sezioni indicate con le lettere A, B, C, D ed E dove sono distribuiti i medicinali in relazione al decrescere del loro potenziale di abuso, nelle tabelle è anche indicato il regime di dispensazione.**

**Medicinali a base di morfina e sostanze analgesiche oppiacee**

**Medicinali di origine vegetale a base di Cannabis**

**Barbiturici**

**Benzodiazepine (diazepam, flunitrazepam, lorazepam ecc.)**

# Metabolismo delle sostanze psicoattive



Sostanza

Enzimi epatici



PRODOTTI

**Metaboliti**



i prodotti del processo di trasformazione che subisce la sostanza inserita nel nostro sistema e che ha la funzione di renderla più facilmente eliminabile.



Il THC viene rapidamente metabolizzato nel fegato.

**Cit-P450**

11-idrossi tetraidrocannabinolo (OH-THC):  
principale metabolita psicoattivo in grado di  
superare rapidamente la barriera encefalica

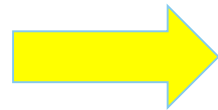


**Deidrogenasi**

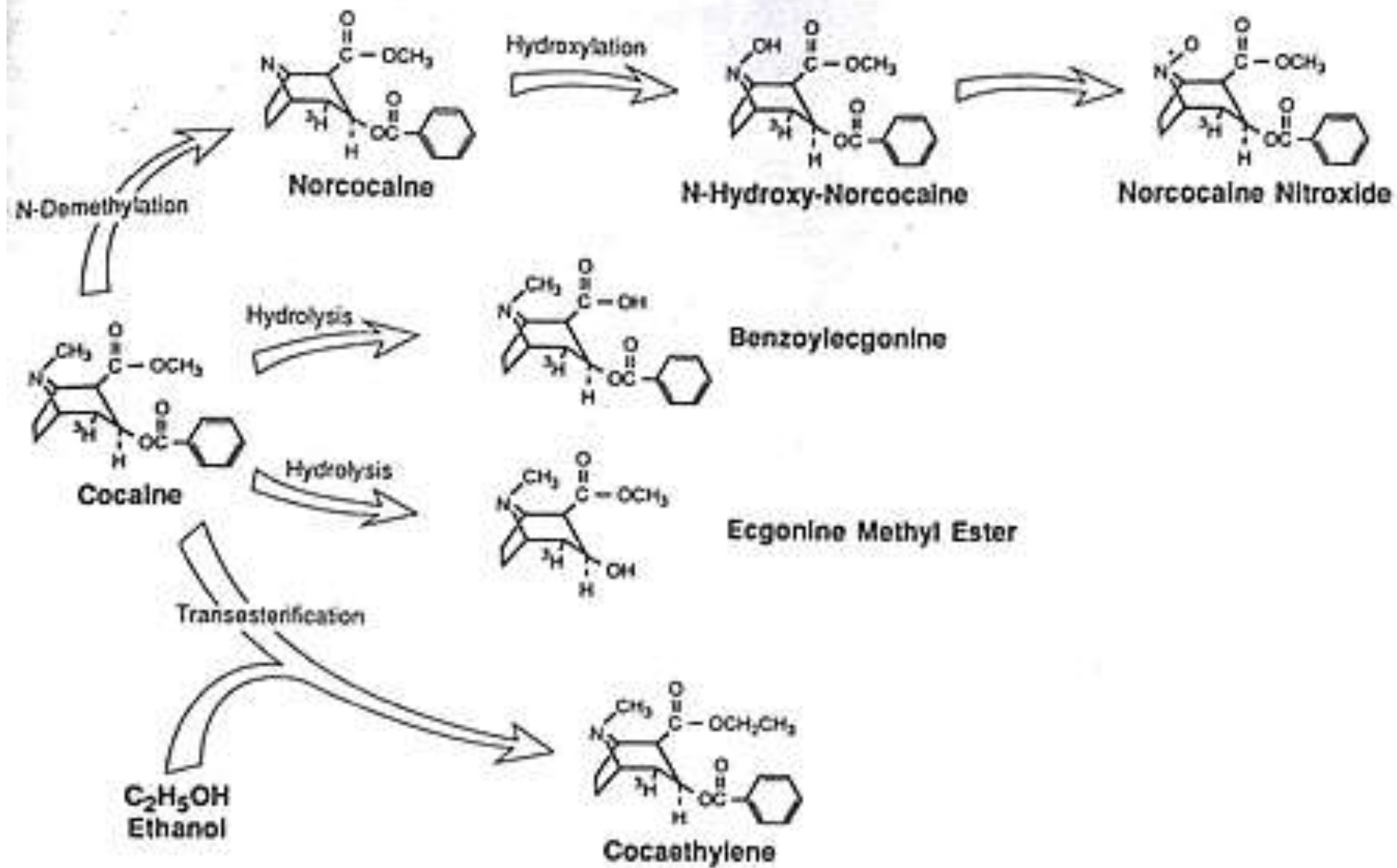


11-nor-9-carbossi-tetraidrocannabinolo (THC-COOH):  
prodotto di ossidazione del OH-THC

Metaboliti di II Livello



Coniugazione con acido Glucuronico



## Metaboliti

## Biomarkers di assunzione



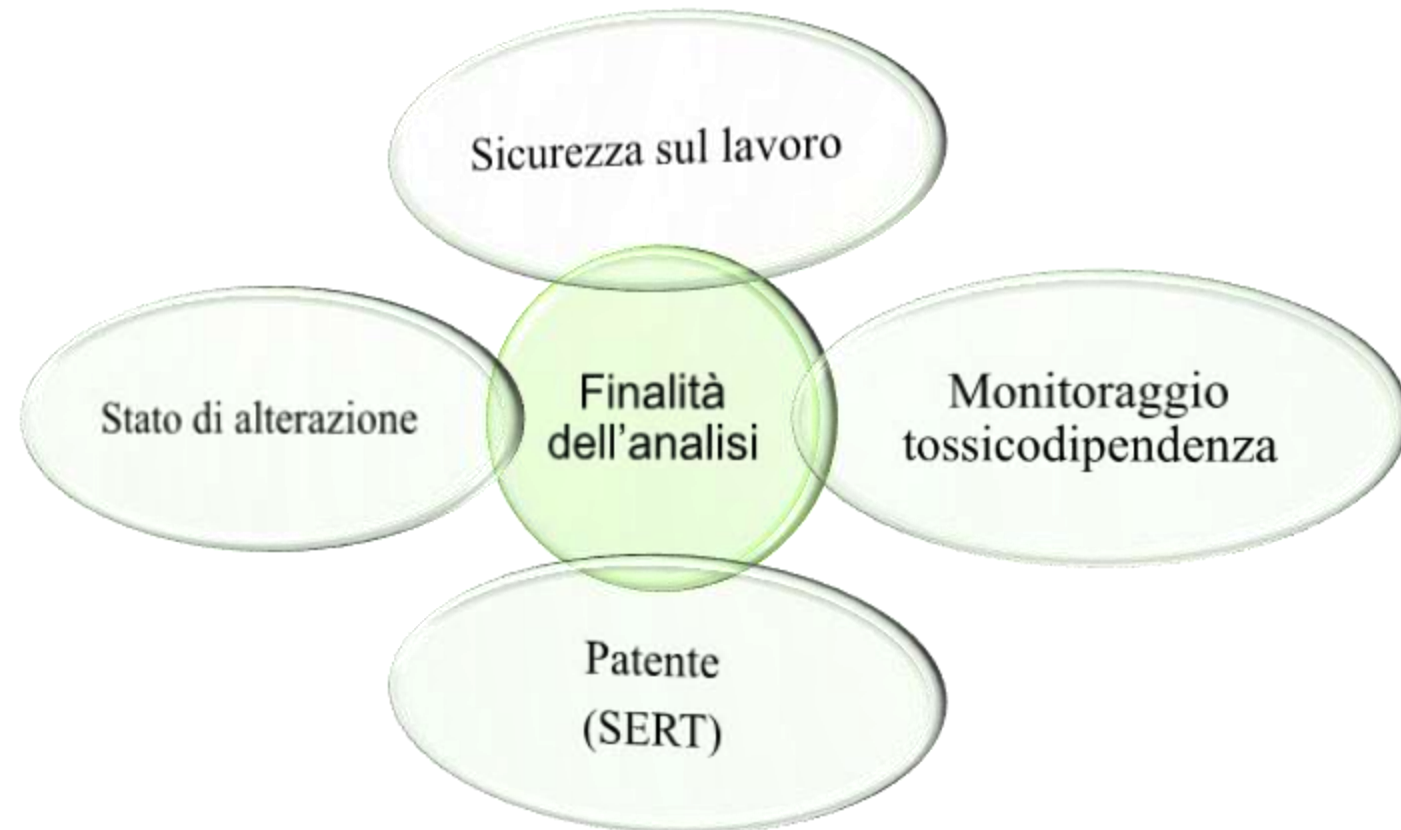
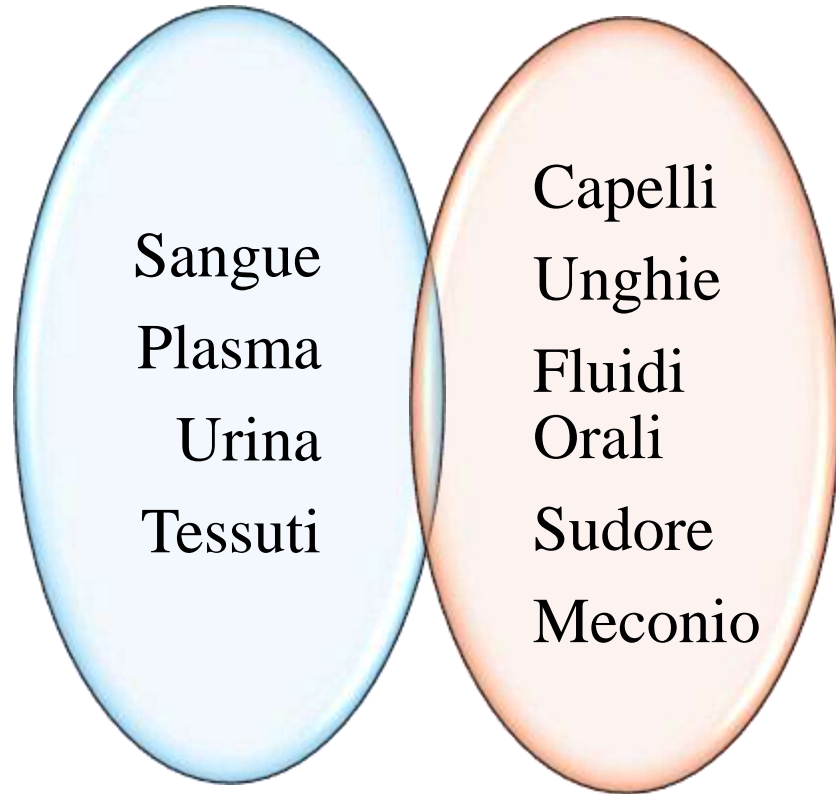
Tutte quelle sostanze che possono essere considerate analiti target nel metodo e che consentono di discriminare tra l'assunzione e il contatto passivo con la molecola parent

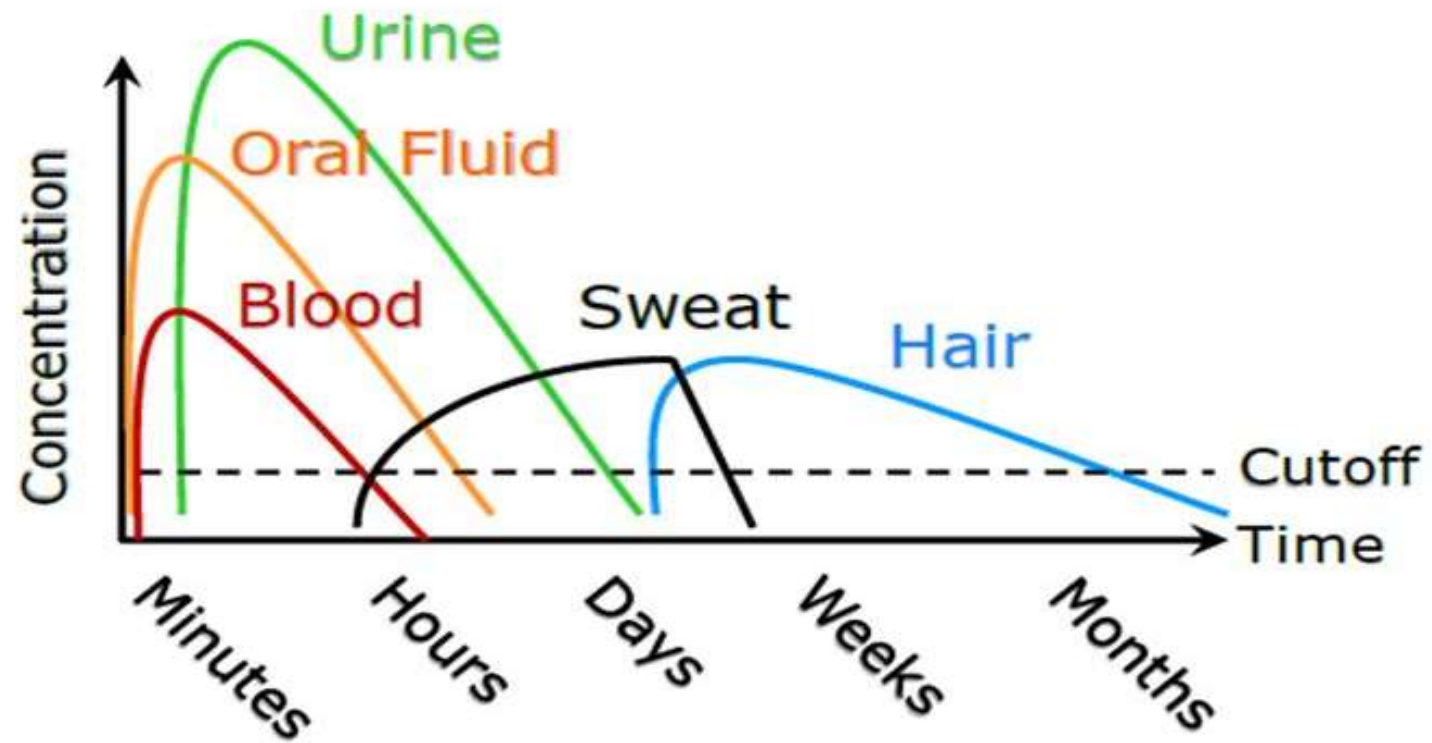
***Come si può stabilire se il soggetto ha assunto sostanze psicoattive?***



Matrici  
CONVENZIONALI


Matrici NON  
CONVENZIONALI





## **VALORE SOGLIA**

Limite di concentrazione definito per stabilire se un campione è positivo o negativo

 U.S. Department of Health & Human Services

**SAMHSA**  
Substance Abuse and Mental Health  
Services Administration



Associazione  
Scientifica  
**Gruppo Tossicologi  
Forensi Italiani**



# Procedura di controllo



Fermo  
Autorità  
competenti FFO



Prelievo del  
campione da  
parte  
dell'operatore



Può essere effettuato  
direttamente dall'operatore



Test di  
screening



Valutazione di  
eventuale alterazione  
psicofisica da parte  
del personale  
sanitario



Test di  
screening  
**NEGATIVO**

Test di  
screening  
**POSITIVO**



Test di  
conferma



Deve essere effettuato da personale  
qualificato e presso laboratori certificati

- Servono per evidenziare e isolare i campioni positivi nel minor tempo possibile.
- Metodi rapidi, semplice e applicabili anche da personale che non possiede conoscenze specifiche.
- Devono essere in grado di limitare l'errore, e soprattutto il numero di falsi negativi.



Generalmente si basano su test **IMMUNOCHEMICI**

Rispondono in base all'interazione antigene anticorpo

## PRO

- Rapidi
- Semplici
- Economici

## CONTRO

- SOLO Qualitativi
- n. di sostanza analizzabili LIMITATE
- Identifica CLASSI di sostanze
- Falsi positivi e falsi negativi
- Ha valenza esclusivamente clinica



- **Caratteristiche che prescindono dal tipo di matrice**



- **Generalmente condotti con tecniche cromatografiche accoppiate alla rivelazione condotta in spettrometria di massa**
- Sono analisi **SENSIBILI** e **SPECIFICHE** – Si ricercano i singoli analiti e non solo le classi di appartenenza
- I test di conferma hanno valenza amministrativa e medicolegale
- Risposta **QUALITATIVA** e **QUANTITATIVA**

Con la spettrometria di massa si riesce ad ottenere la cosiddetta *impronta digitale* della sostanza anche a concentrazioni molto basse, consentendo un risultato legalmente valido ed inequivocabile

Ogni molecola reagisce in maniera differente e caratteristica in spettrometria di massa. Ciò si esprime sia in modalità di ionizzazione sia nel risultato della sua frammentazione. Ogni molecola frammenta in modo peculiare, definendo il pattern di frammentazione caratteristico.



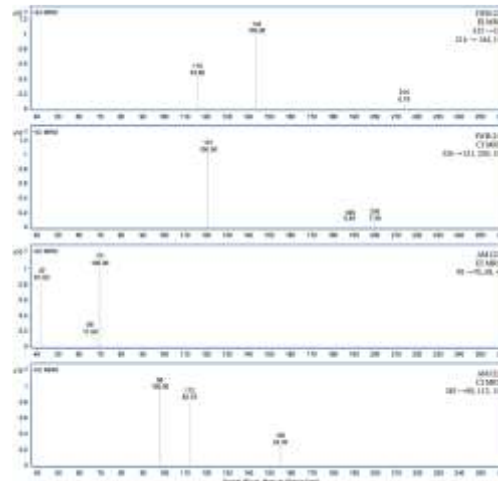
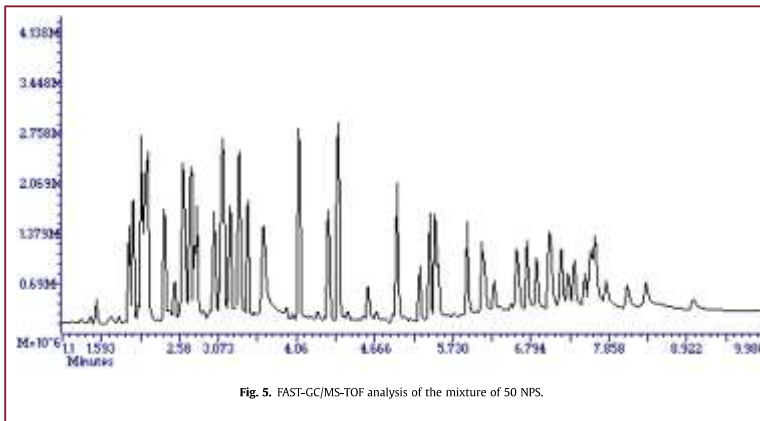
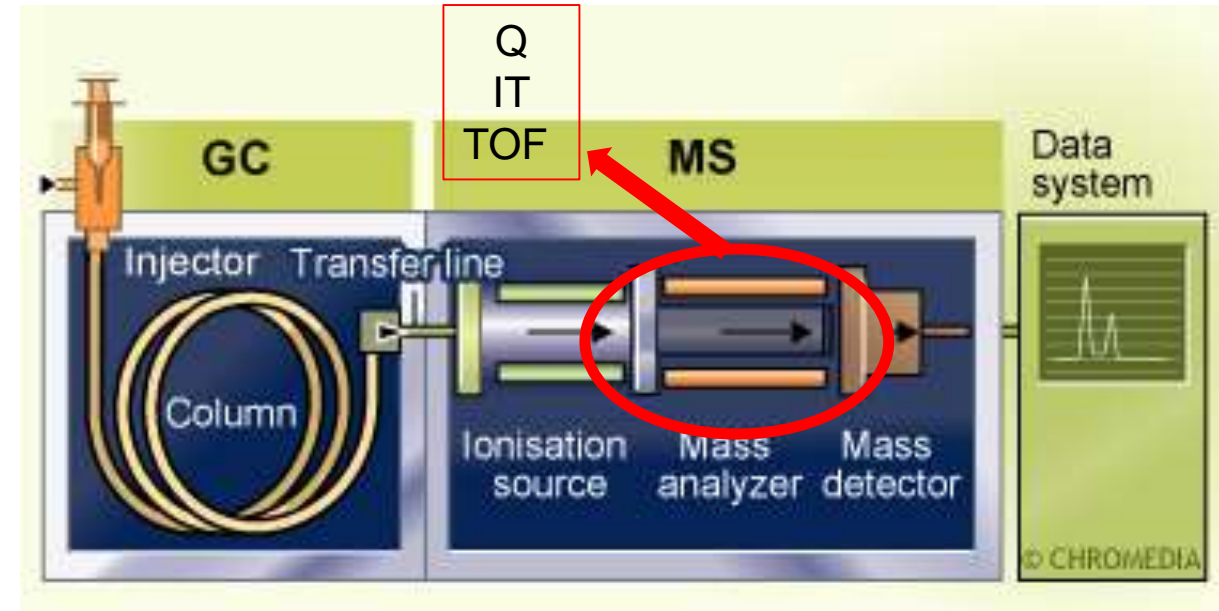
Modalità di acquisizione:

## Full scan (FS)

Scansione  
Ampio range m/z  
Bassa sensibilità

## Selected Ion Monitoring (SIM)

Selezione  
Scansione veloce  
Alta sensibilità



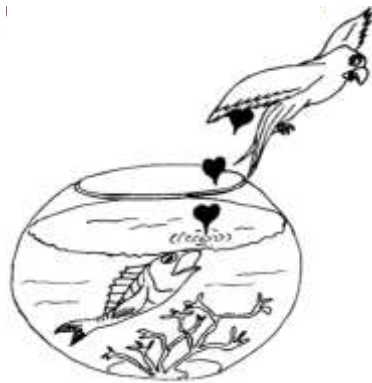
## Identificazione:

- ✓ Tempo di ritenzione
- ✓ Spettro di massa
  - Picco BASE
  - Frammenti
  - Rapporto tra i frammenti

Standard

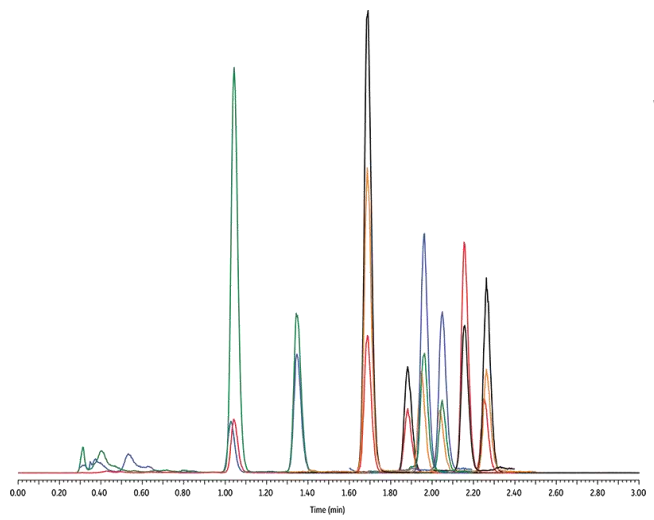
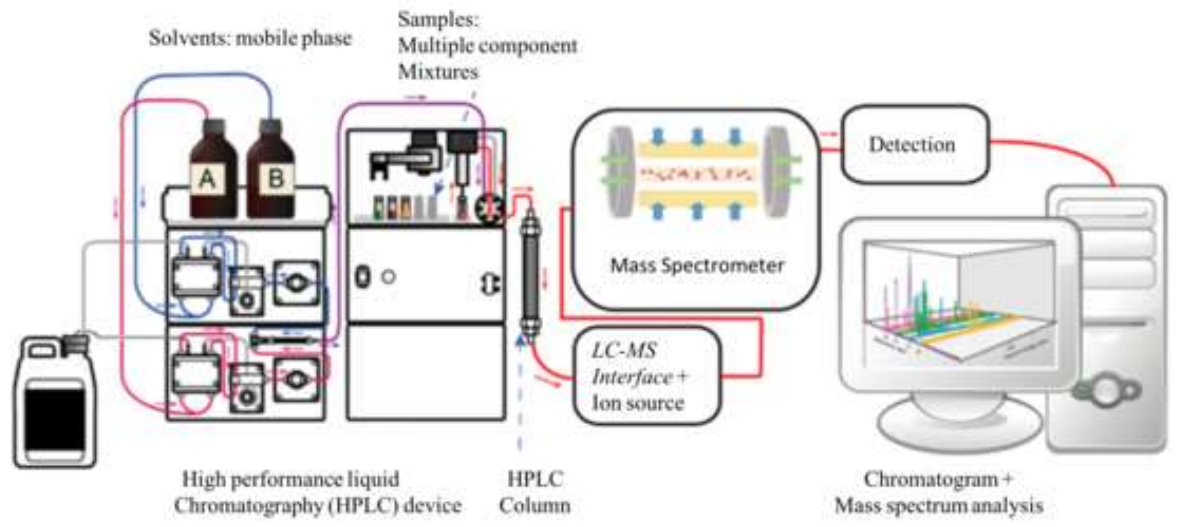
Banca Dati

# Conferma HPLC-MS(/MS)



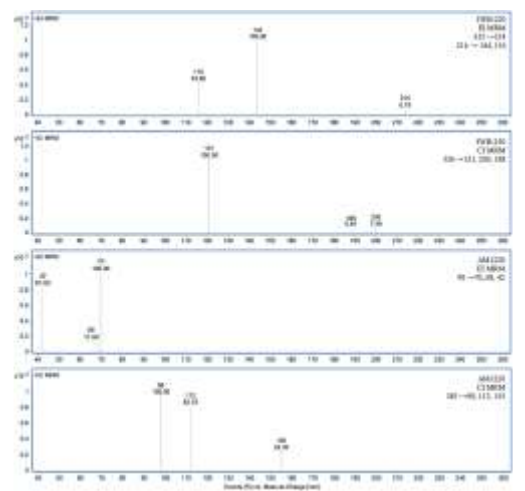
## Identificazione:

- ✓ Tempo di ritenzione
- ✓ Spettro di massa
  - Transizione ione precursore/ione frammento
  - Rapporto tra le transizioni più intense



Standard

Banca Dati



**MS**


**MS/MS**

**MS<sup>n</sup>**

**Targeted, Semi-Targeted, Suspect**



Matrici



Tecniche

Qualche esempio di protocolli analitici



## Sub Campionamento

- Si preleva l'aliquota di campione necessaria a svolgere l'analisi,

## Lavaggio o decontaminazione

- Procedura necessaria su campioni cheratinici
- Rimuove le possibili contaminazioni esterne

## Estrazione

- Gli analiti vengono estratti dalla matrice:
- Diluizione
- Estrazione con solvente
- Precipitazione proteica
- Tecniche combinate

## Clean-up

- LLE
- SPE
- Tecniche miniaturizzate

## Analisi

- GC-MS(/MS)
- LC-MS (/MS)
- HPLC-HRMS (/MS)

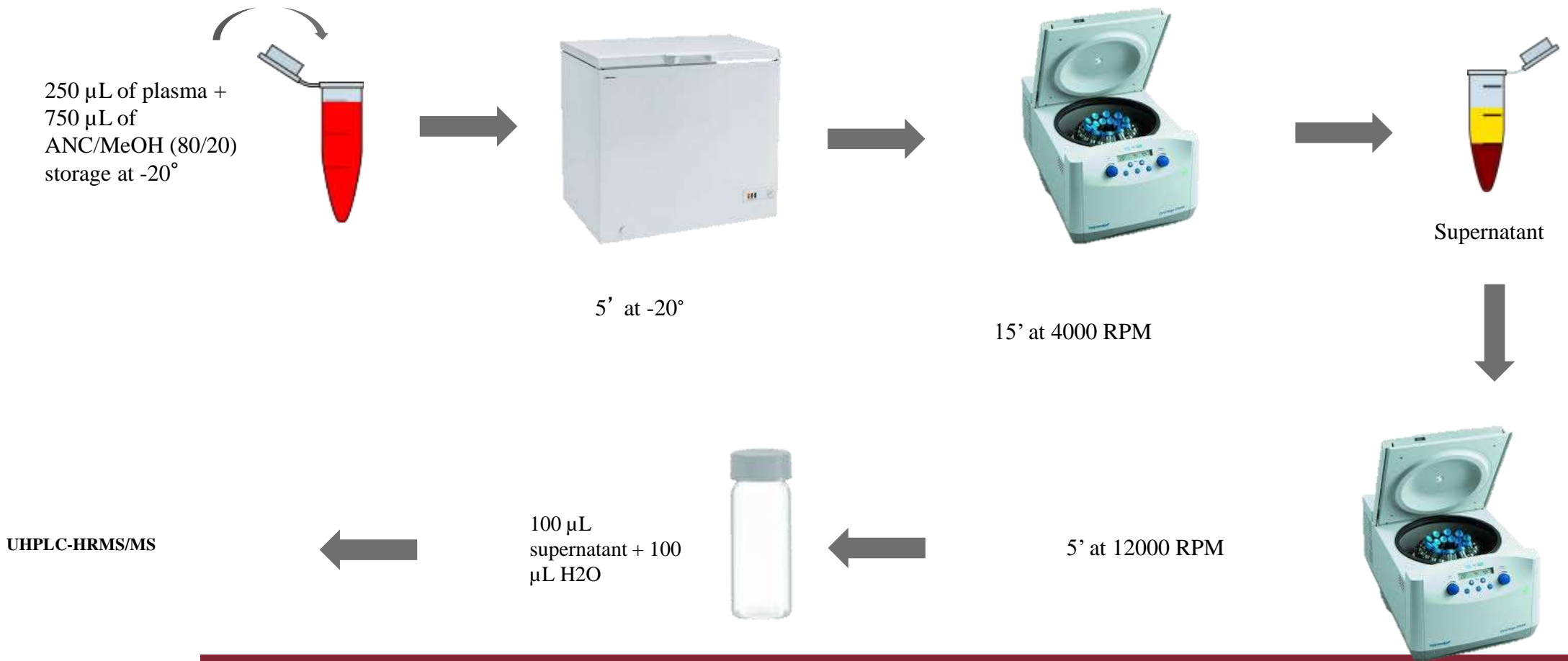




Drugs' extraction from Blood

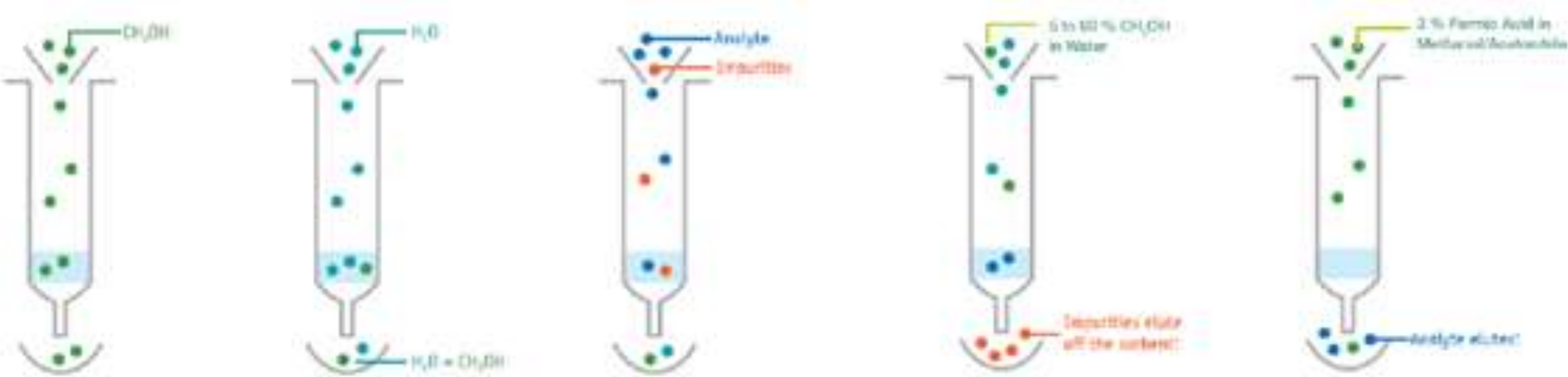
**Protein precipitation**

- Time reduction and automation
- Improve clean-up
- New trends: PP plates



# Clean-up SPE

- Time reduction
- Improve selectivity
- Miniaturization, reduction of sample volume
- New trends: MISPE, SPME, MEPS, monolith spin extraction



ACTIVATION

CONDITIONING:

LOADING:  
Sample

WASHING

ELUTION:

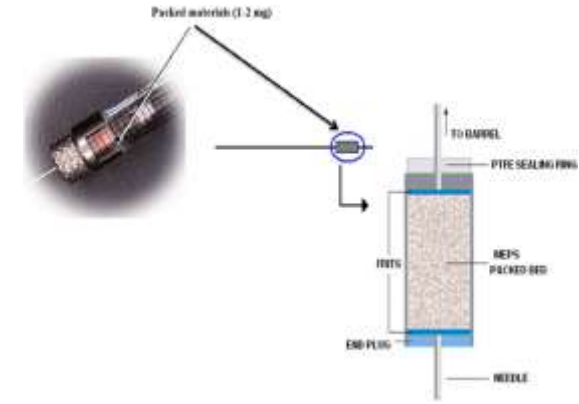


UHPLC-HRMS/MS

Drugs' extraction from Oral Fluid

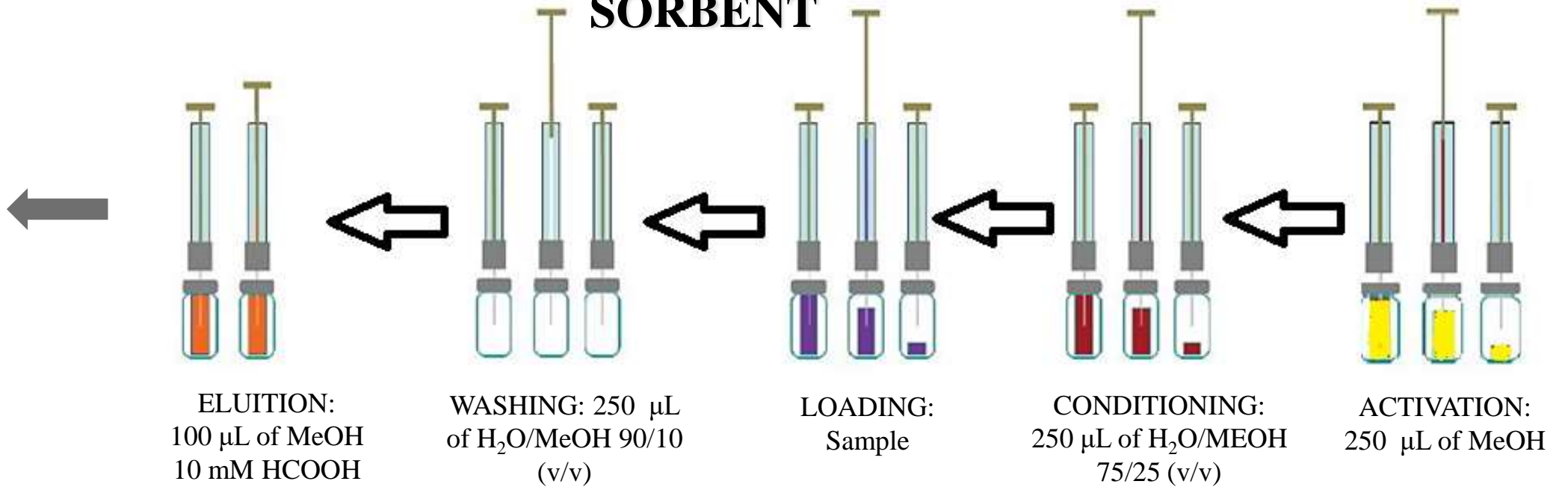
MEPS

- ✓ Few mg of stationary phase
- ✓ Reduction of sample volume to 10-100  $\mu\text{L}$
- ✓ Reduction of organic solvent needed



## MICRO EXTRACTION BY PACKED SORBENT

HPLC-MS/MS



## Urine analysis

## HPLC-MS/MS

MRM- 5 window

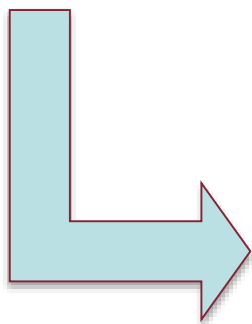
### HYDROLYSIS

enzimatic with  $\beta$ -Glucuronidase  
from E.Coli

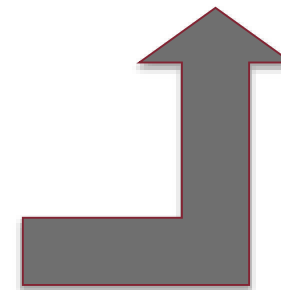


*Chromatography:* Micro-Lc Pump Perkin-Elmer serie 200; Col. Brownlee SPP packed with core-shell particles (2.7  $\mu$ m, 2.1 x 150 mm); mobile phases: MeOH:can 5mM HCOOH (A) and water 5 mM HCOOH (B);

*Mass Spec:* API 2000 AB-Sciex  
ESI+,urboionspray, MRM  
Total time 15 min



**CLEAN-UP**  
SPE



Drugs' extraction from hair

**PLE**



- T: 150° C
- P: 100 barr
- Extraction solvent:  
H<sub>2</sub>O/2-Propanol 80/20  
pH3,5
- Cycles: 1



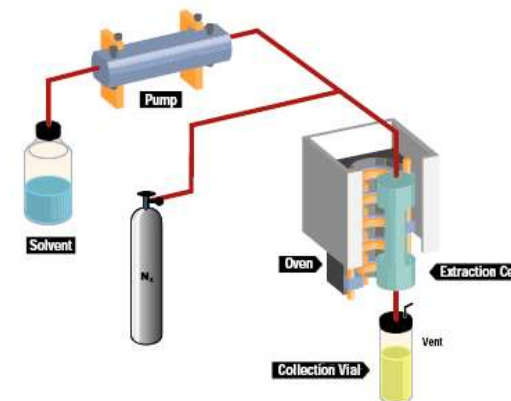
9000 rpm  
5 min

5 mL



**Clean-up**

UHPLC-MS/MS



- Rapid extraction from sample with high temperature and pressure solvents
- Features:
  - ✓Reduced use of organic solvents: water is the main extractant solvent (PHWE)
  - ✓Different classes in one process
  - ✓Automated process- reproducibility
  - ✓Reduced analysis time





## ...Nuove Sostanze Psicoattive



## New psychoactive substances



Younger adults  
(15-24)

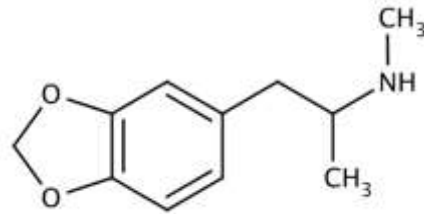
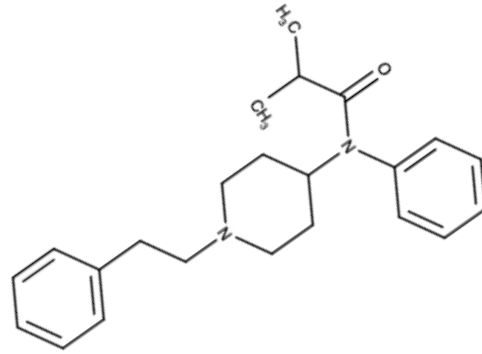
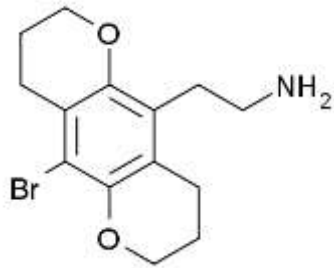
Last year

3.0 %

Used:

Lifetime

8.0 %



## New Psychoactive Substances - NPS

«Il termine Nuove Sostanze Psicoattive (NPS) è definito da UNODC come “sostanze da abuso, sia in forma pura che come preparazione, che non rientra nella lista del Single Convention on Narcotic Drugs (1961) o nella Convention on Psychotropic Substances (1971), ma che rappresentano un rischio effettivo per la salute pubblica»

### Situazione legale:

**Sono legistate dalle normative dei singoli paesi**



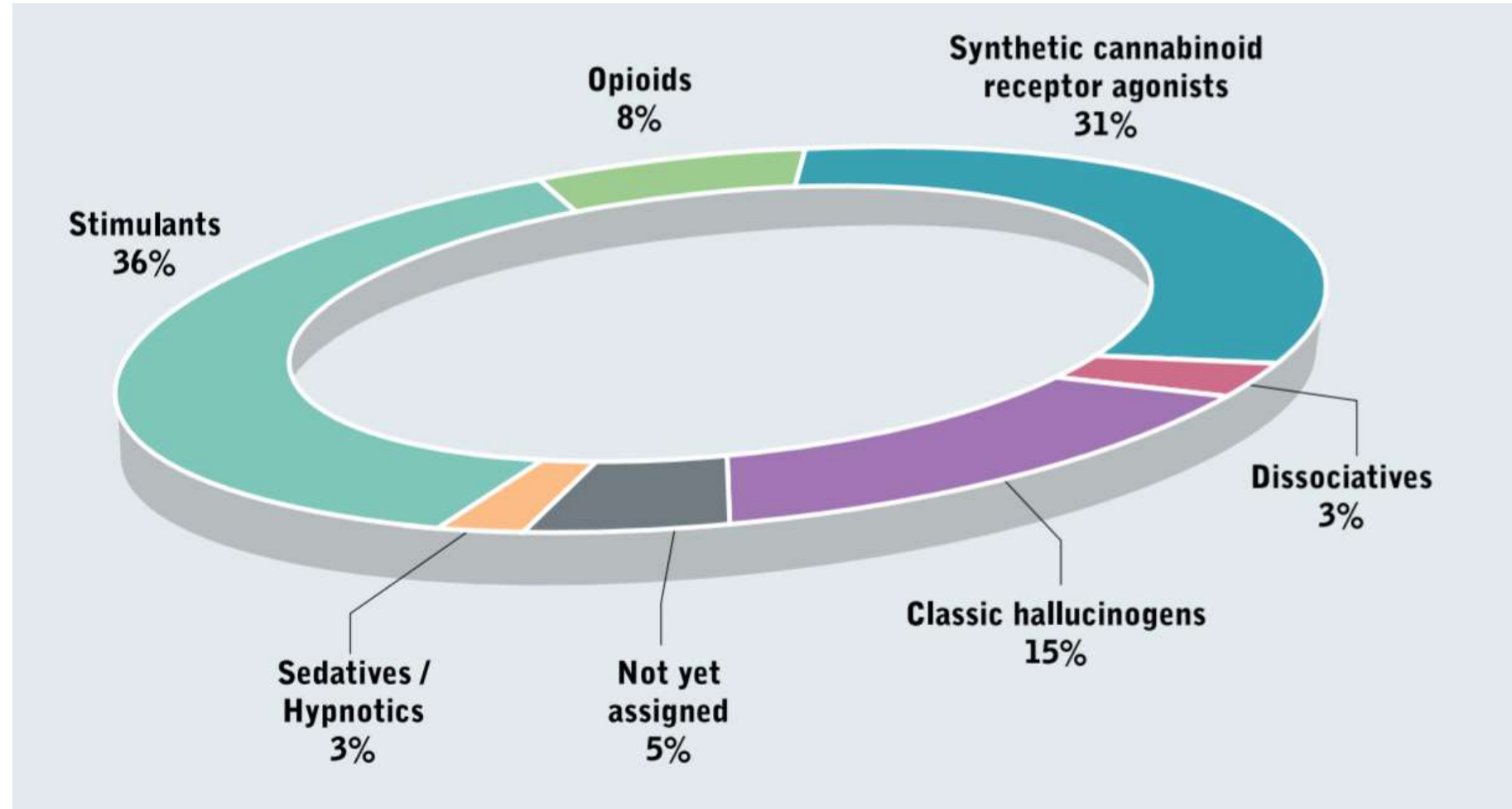
**DPR 309/90**



**Early warning system (EWS)**

Approccio generico: attenzionare gli analoghi e i precursori

950 NPS sono state riportate fino a Dicembre al sistema EWS



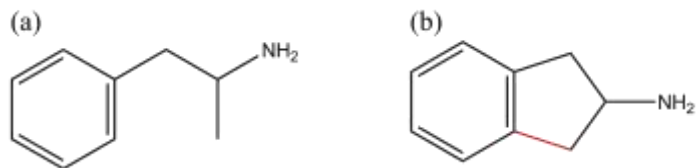
Classification fornita da United Nations Office on Drugs and Crime - UNODC

# NPS - Classificazione



Classification fornita da United Nations Office on Drugs and Crime - UNODC



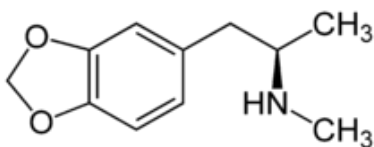


*amphetamine (a) and 2-aminoindane (2-AI) (b)*

The aminoindanes were reported to possess significant analgesic properties.

Potent effects on the release and re-uptake of serotonin were also observed.

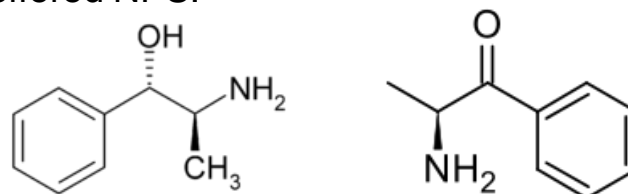
These substances have been sold as NPS for their ability to produce empathogenic and entactogenic effects of serotonin releasing drugs, such as MDMA.



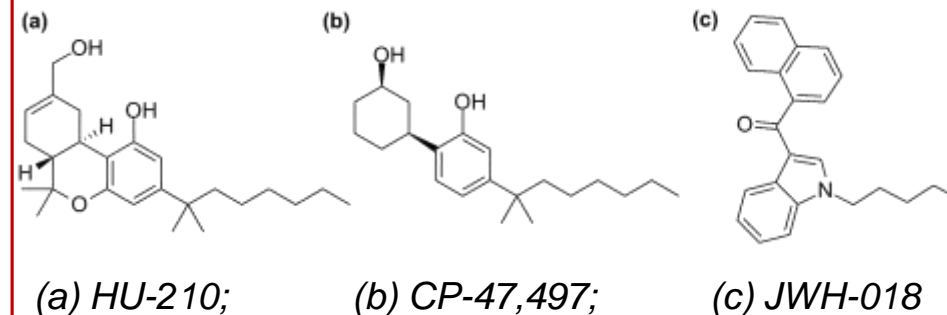
Kath

Kratom

Internet surveys conducted by the EMCDDA in 2008 and 2011 revealed that kratom is one of the most widely offered NPS.



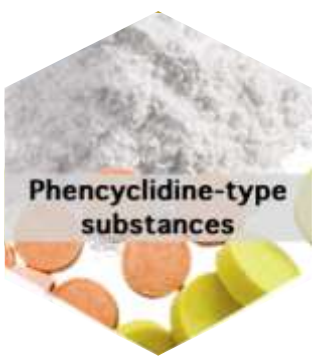
Since 2004, the composition of 'herbal highs' products seems to have substantially changed and now include potent new psychoactive compounds known as synthetic cannabinoids.



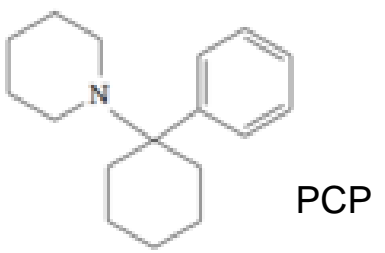
While cannabis and THC are controlled under the international drug control treaties, none of the synthetic cannabinoids are currently under international control. However, several have been subject to control measures at the national level.



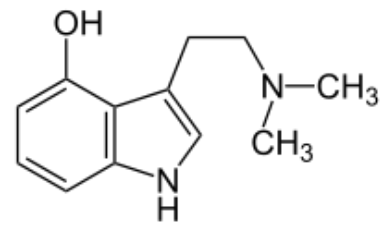
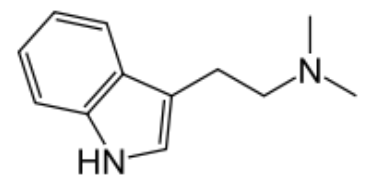
# NPS - Classification



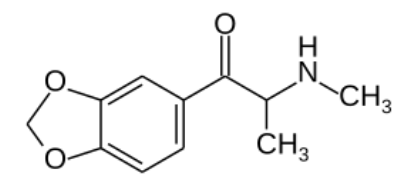
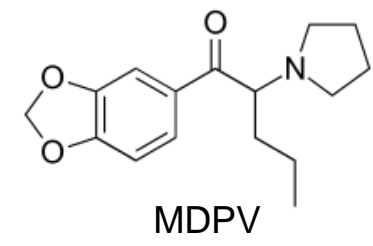
Phencyclidine-type substances show structural similarity to phencyclidine (PCP) and ketamine. Phencyclidine-type substances act as central nervous system stimulants, or dissociatives.



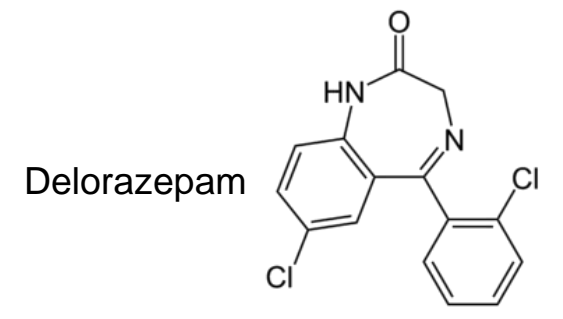
Tryptamine and its derivatives that have been reported as NPS are indolealkylamine molecules. Most are psychoactive hallucinogens found in plants, fungi and animals .



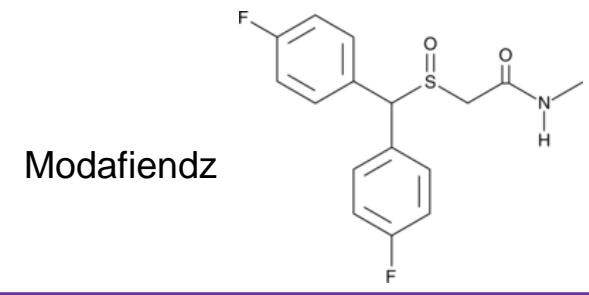
Synthetic cathinones are  $\beta$ -keto phenethylamines and chemically similar to amphetamine and methamphetamine.



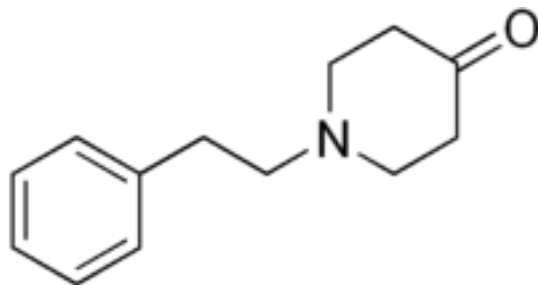
## Sedatives / Hypnotics:



## Stimulants

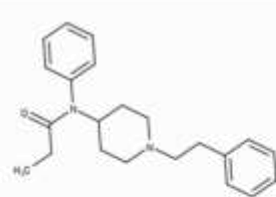


## Precursore

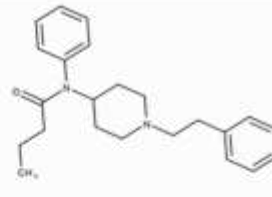


N-Phenethyl-4-piperidinone  
(4-ANPP)

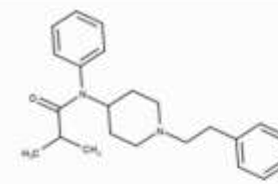
## FENTANYL e I suoi derivati



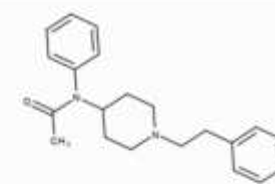
Fentanyl



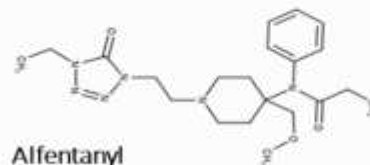
Butyrfentanyl



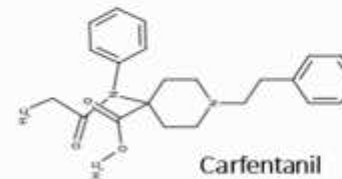
Isobutyrylfentanyl



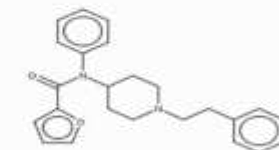
Acetylfentanyl



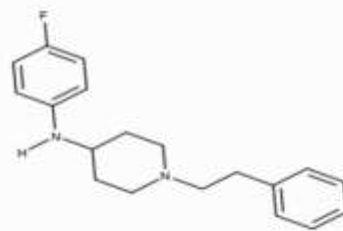
Alfentanyl



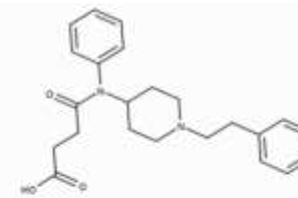
Carfentanil



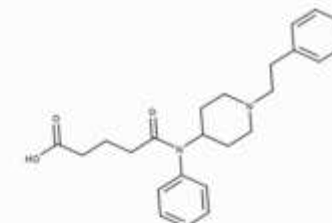
Furanylfentanyl



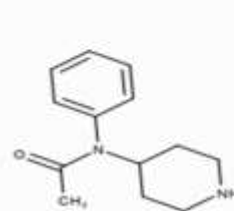
Despropionyl para-Fluorofentanyl



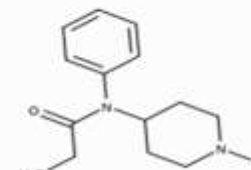
Butyryl fentanyl carboxy metabolite



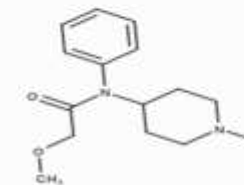
Valeryl fentanyl carboxy metabolite



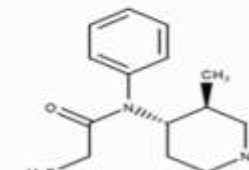
Acetyl norfentanyl



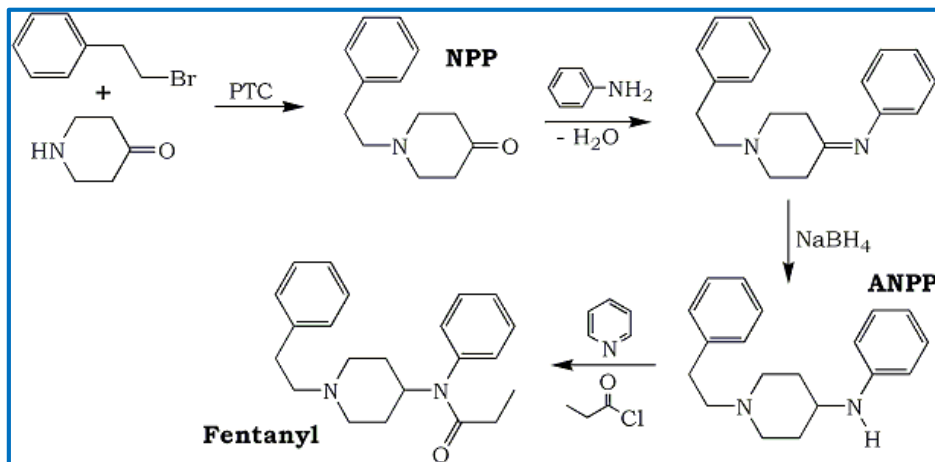
Norfentanyl



Methoxyacetyl norfentanyl



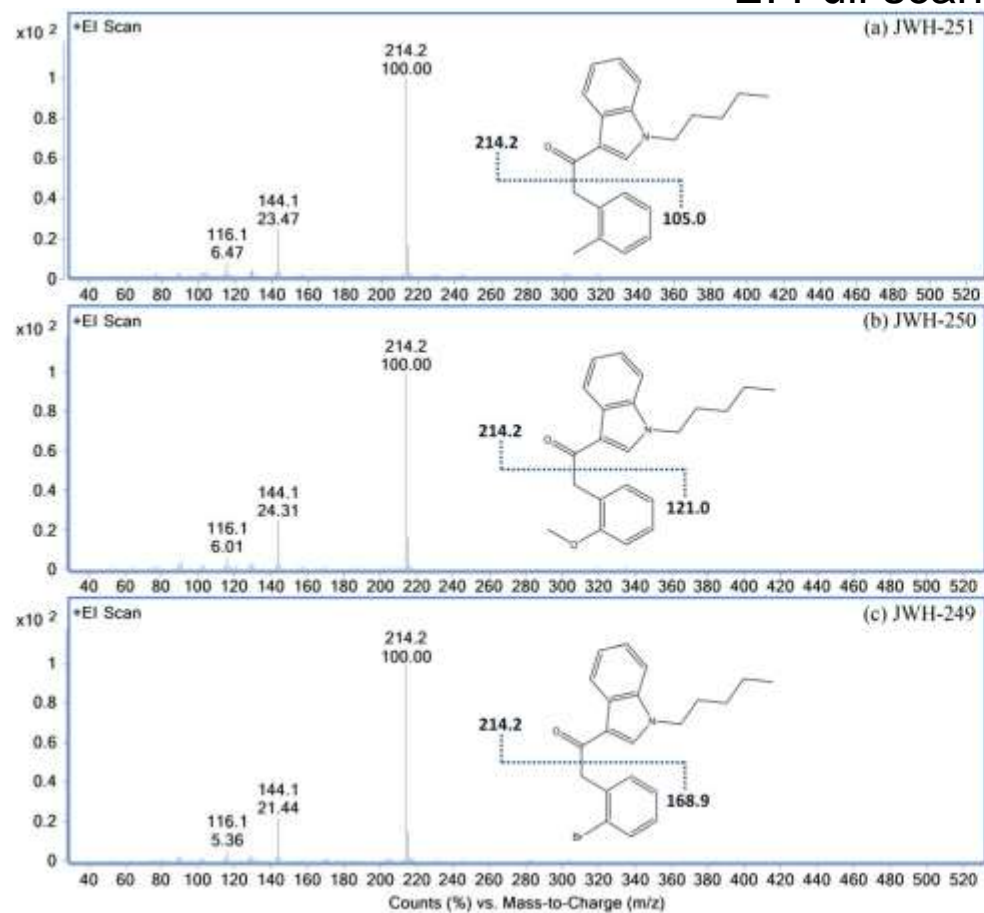
(±)-trans-3-methyl Norfentanyl



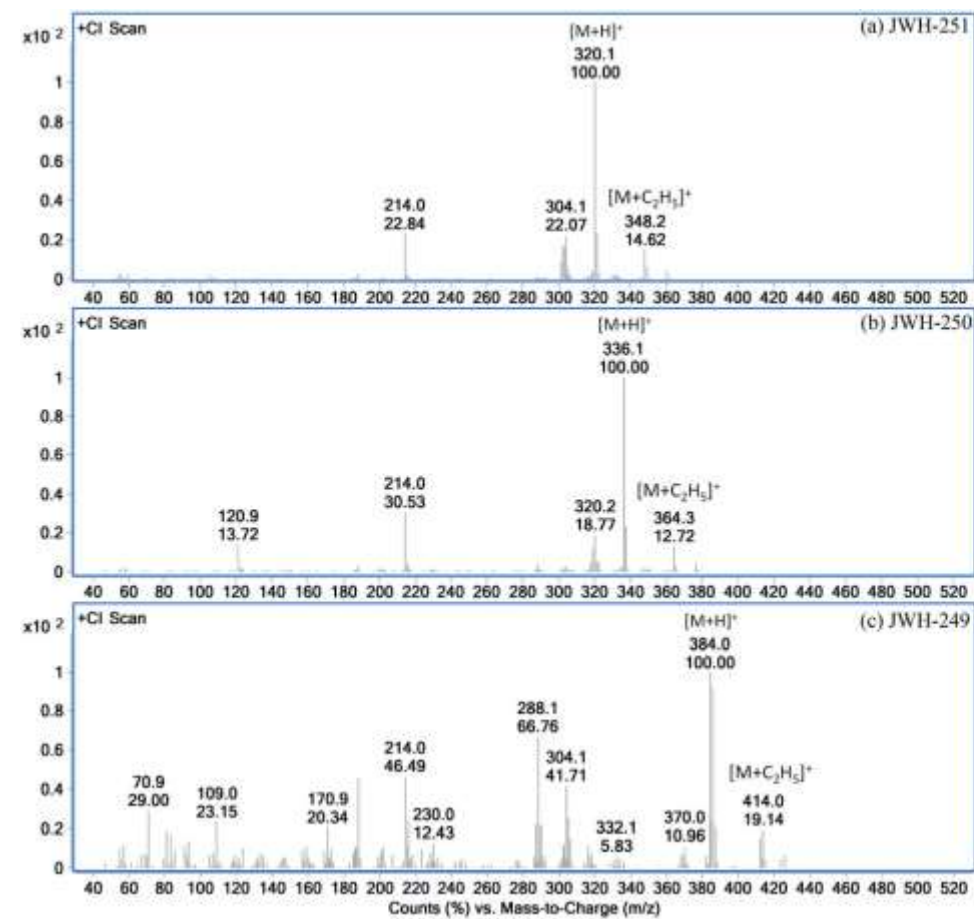
## Qualitative analysis of seized synthetic cannabinoids and synthetic cathinones by gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry

Seongshin Gwak, Luis E. Arroyo-Mora and José R. Almirall\*

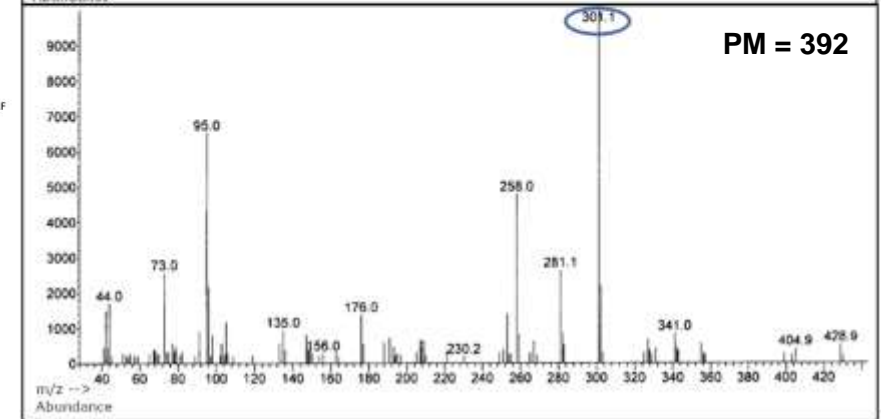
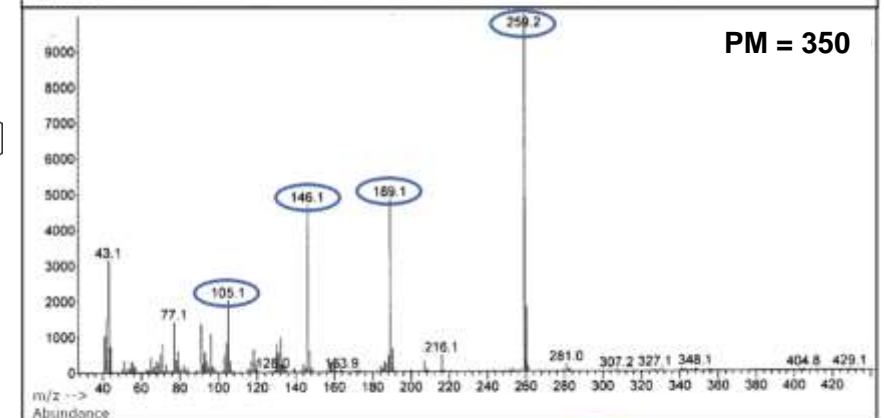
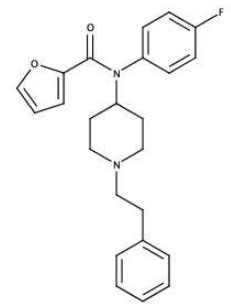
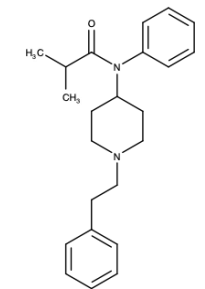
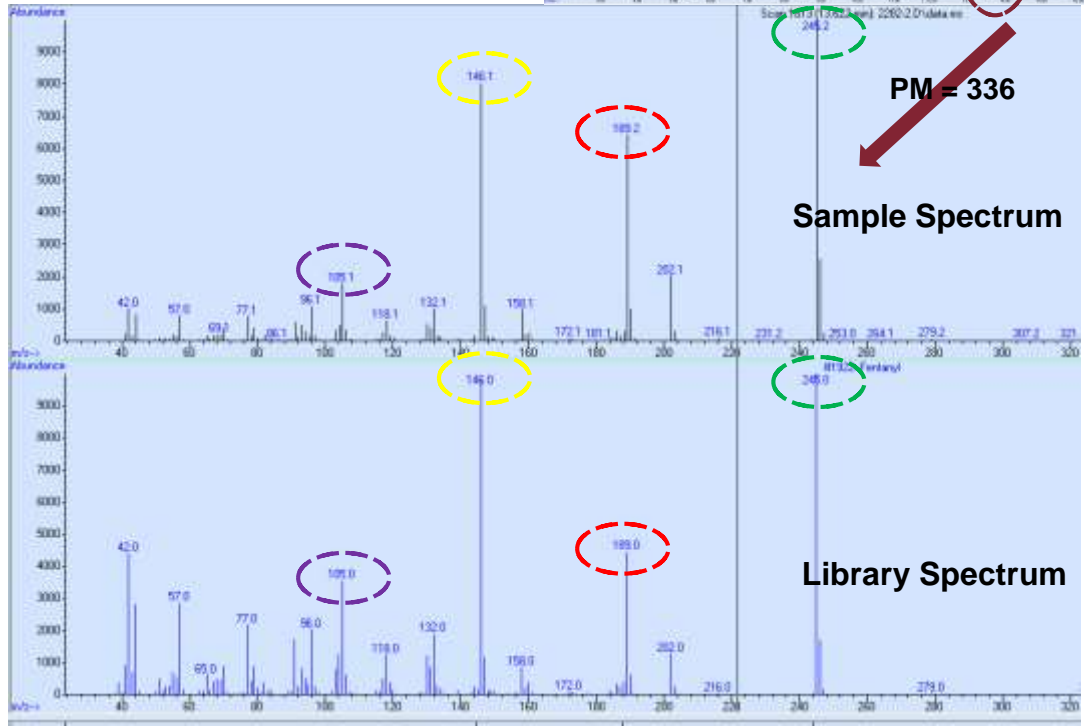
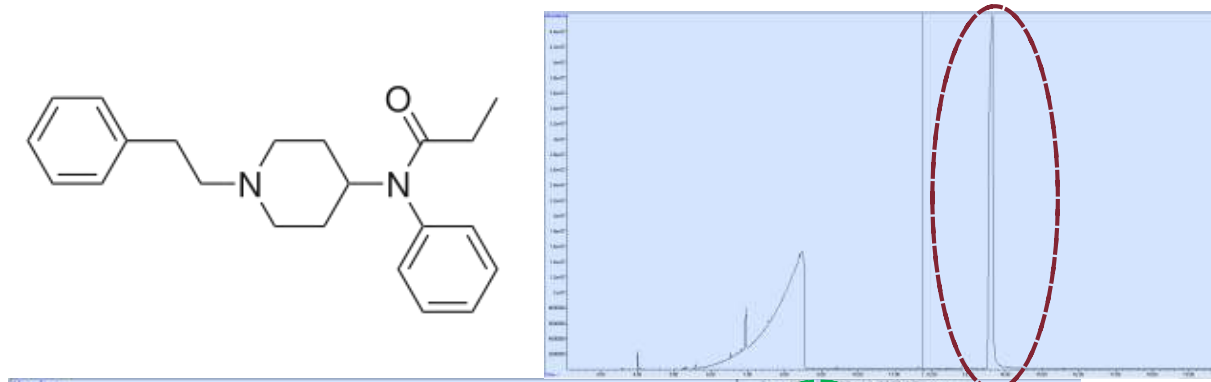
### EI Full scan



### CI Full scan

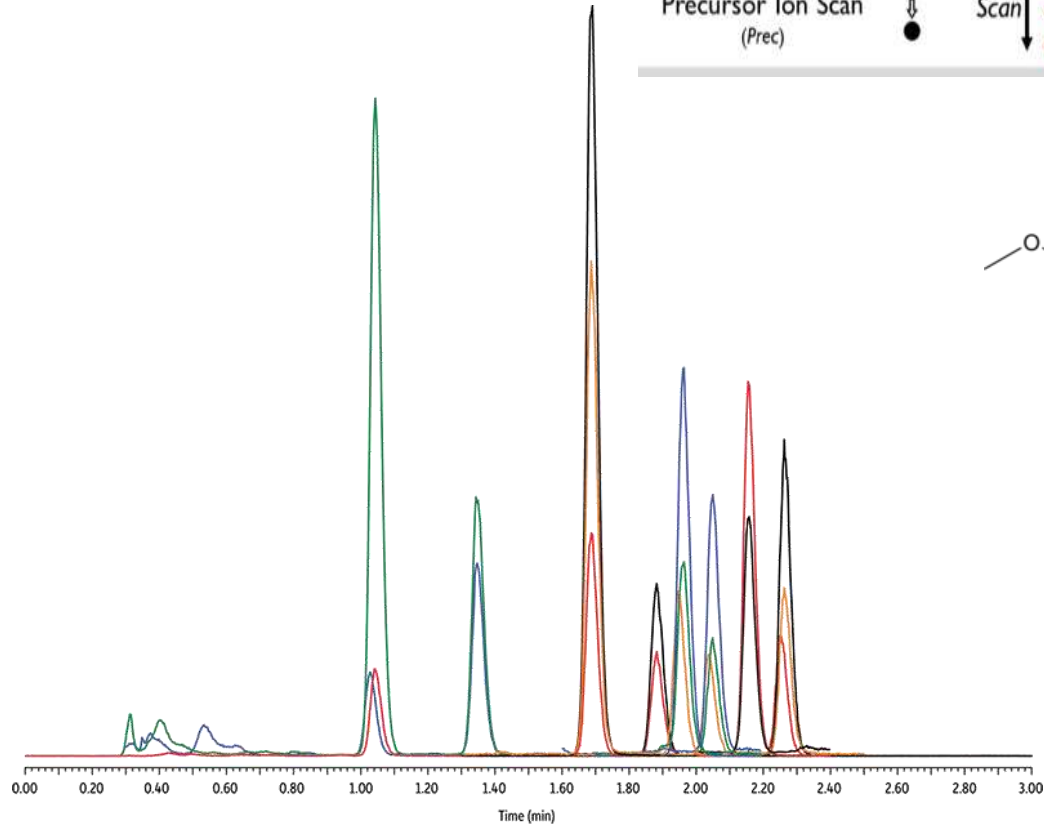
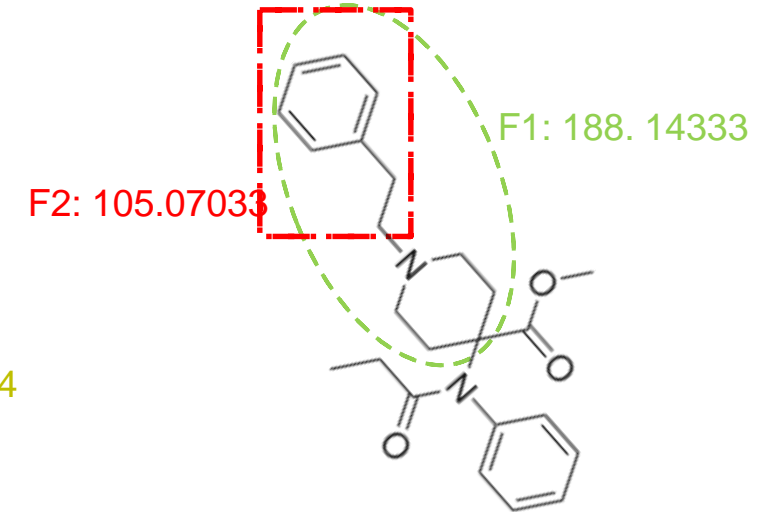
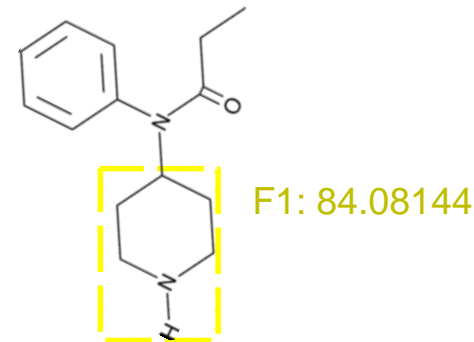
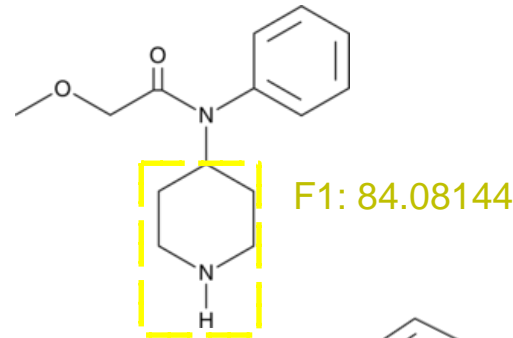
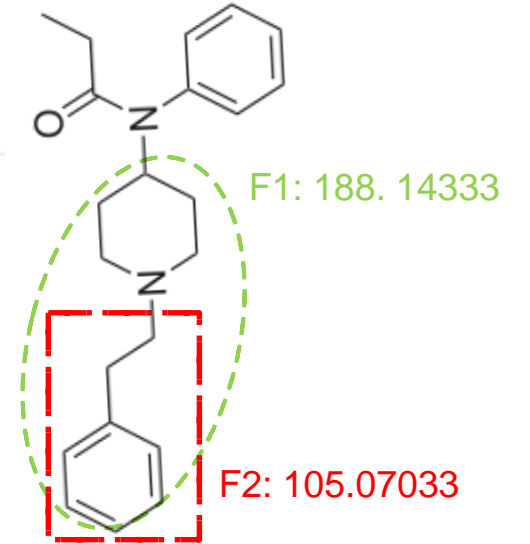
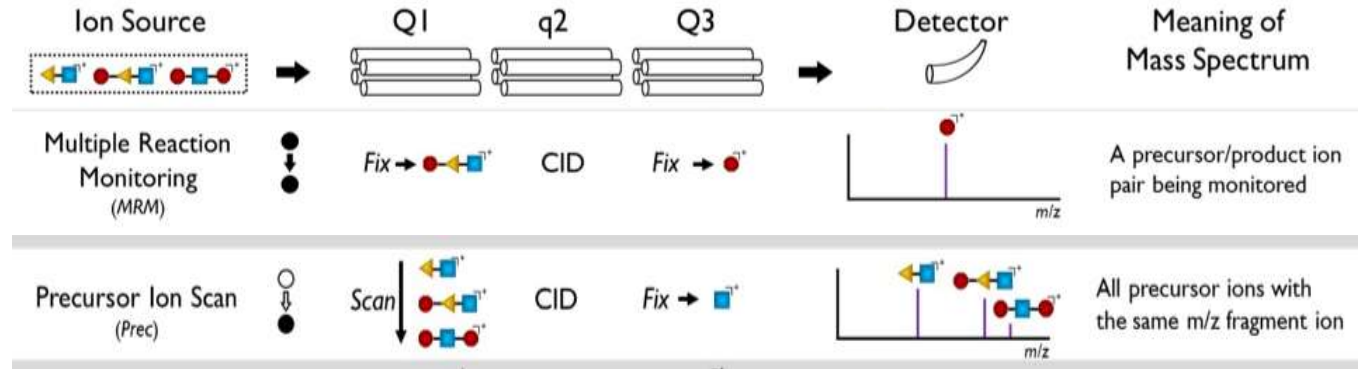


# GC-MS - Applicazioni



T. Breindahl, A. Kimergård, M.F. Andreasen, D.S. Pedersen, Identification of a new psychoactive substance in seized material: the synthetic opioid N -phenyl- N -[1-(2- phenethyl)piperidin-4-yl]prop-2-enamide (Acrylfentanyl), Drug Test. Anal. 9 (2017) 415–422, <https://doi.org/10.1002/dta.2046>.

# FENTANYLS - Analytical techniques: LC-MS/MS





# HPLC-MS(/MS) - Applicazioni

Forensic Science International 301 (2019) 394–401



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/forensi](http://www.elsevier.com/locate/forensi)

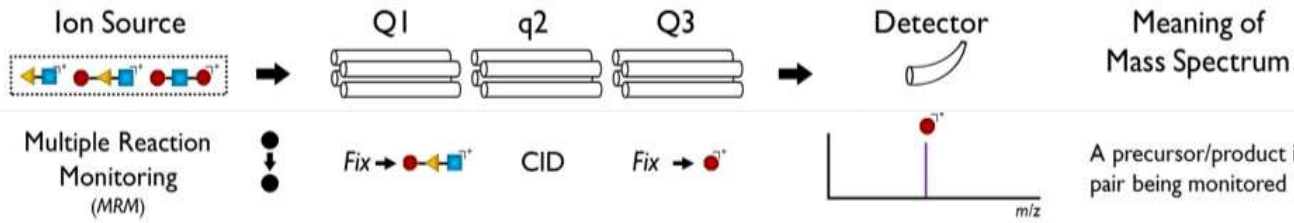


Simultaneous analysis of 2Cs, 25-NBOHs, 25-NBOMes and LSD in seized exhibits using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A targeted approach

Xue Wei Sarah Chia<sup>a,\*</sup>, Mei Ching Ong<sup>a</sup>, Yuan Yuan Cheryl Yeo<sup>a</sup>, Yanqing Joanne Ho<sup>a</sup>, Edelia Izzati Binte Ahmad Nasir<sup>a</sup>, Lin-Li Jaime Tan<sup>a</sup>, Puay Yun Chua<sup>b</sup>, Tiong Whei Angeline Yap<sup>a</sup>, Jong Lee Wendy Lim<sup>a</sup>

<sup>a</sup> illicit Drugs Laboratory, Health Sciences Authority, 11 Outram Road, Singapore 160078, Singapore

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, National University of Singapore, 6 Science Drive 2, Singapore 117546, Singapore

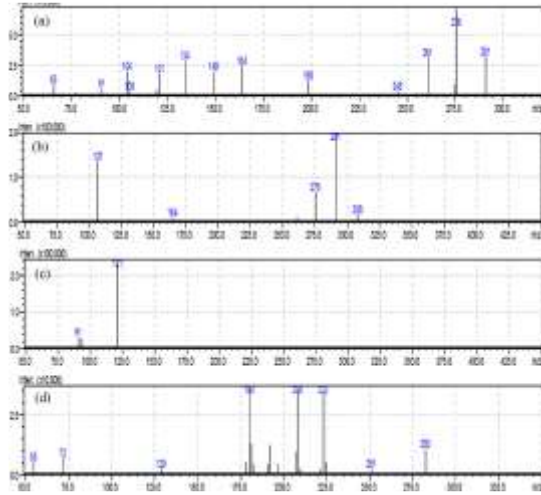


Meaning of Mass Spectrum

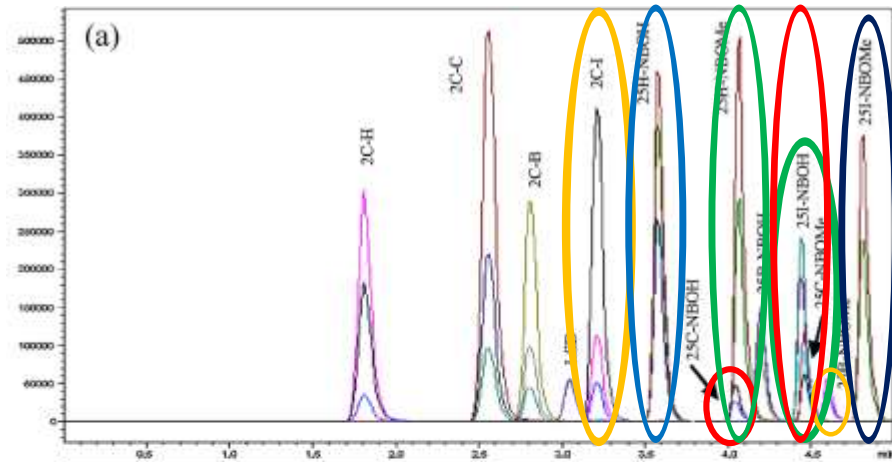
Multiple Reaction Monitoring (MRM)



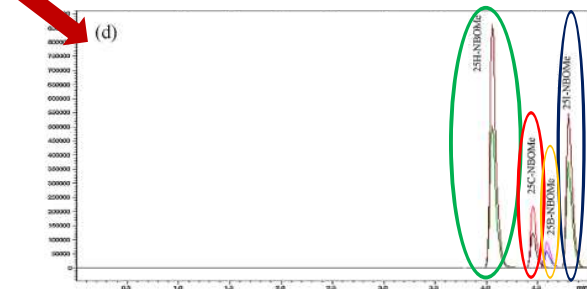
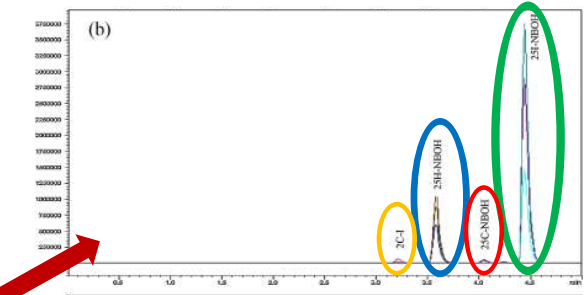
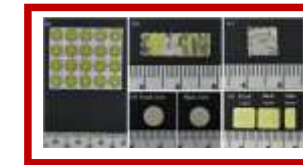
A precursor/product ion pair being monitored



1. Ricerca delle più opportune condizioni operative dello spettrometro di massa



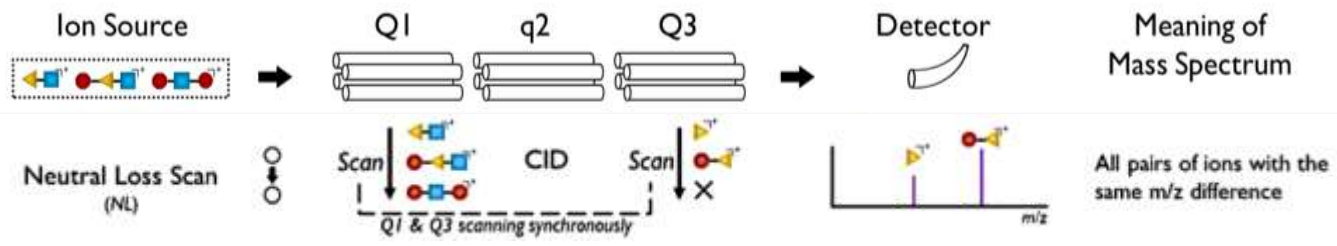
2. Messa a punto di un efficiente metodo cromatografico



## Identificazione:

- ✓ Tempo di ritenzione
- ✓ DUE Transizioni ione precursore/ione frammento





# HPLC-MS(/MS) - Applicazioni

Forensic Toxicology (2019) 37:34–44  
<https://doi.org/10.1007/s11419-018-0432-y>



ORIGINAL ARTICLE



Rapid tentative identification of synthetic cathinones in seized products taking advantage of the full capabilities of triple quadrupole analyzer

David Fabregat-Safont<sup>1</sup> · Juan V. Sancho<sup>1</sup> · Félix Hernández<sup>1</sup> · María Ibáñez<sup>1</sup>

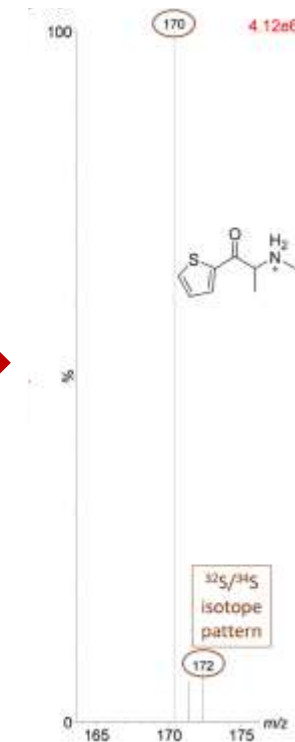
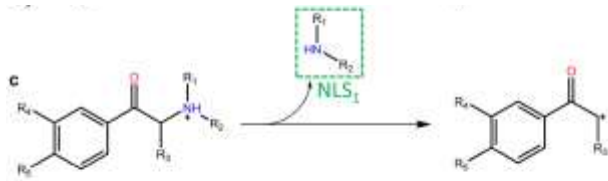
## Catinoni Sintetici

- $R_1$ : H, methyl (if  $R_2$  is methyl)
- $R_2$ : H, methyl, ethyl, isopropyl
- $R_1+R_2$ : pyrrolidine
- $R_3$ :  $C_nH_{2n+2}$  ( $n=1-4$ )
- $R_4$ : H, halogen atom (if  $R_5$  is H), methyl (if  $R_5$  is H or methyl), ethyl (if  $R_5$  is H), methoxy (if  $R_5$  is H or methoxy)
- $R_5$ : H, halogen atom (if  $R_4$  is H), methyl (if  $R_4$  is H or methyl), ethyl (if  $R_4$  is H), methoxy (if  $R_4$  is H or methoxy)
- $R_4+R_5$ : 3,4-methylenedioxy, cyclopentane, cyclohexane

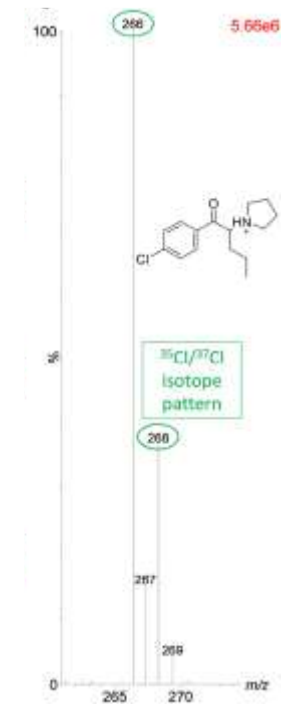


Amine functionalization

Alkyl chain length	$H_2N$	$HN$	$H_2N$	$H_2N$	$HN$
$NLS_1$	31.04 Da	45.06 Da	45.06 Da	59.07 Da	71.07 Da
	59.07 Da	73.09 Da	73.09 Da	87.10 Da	99.10 Da
	73.09 Da	87.10 Da	87.10 Da	101.12 Da	113.12 Da
$NLS_2$	87.10 Da	101.12 Da	101.12 Da	115.14 Da	127.14 Da
	101.12 Da	115.14 Da	115.14 Da	129.15 Da	141.15 Da

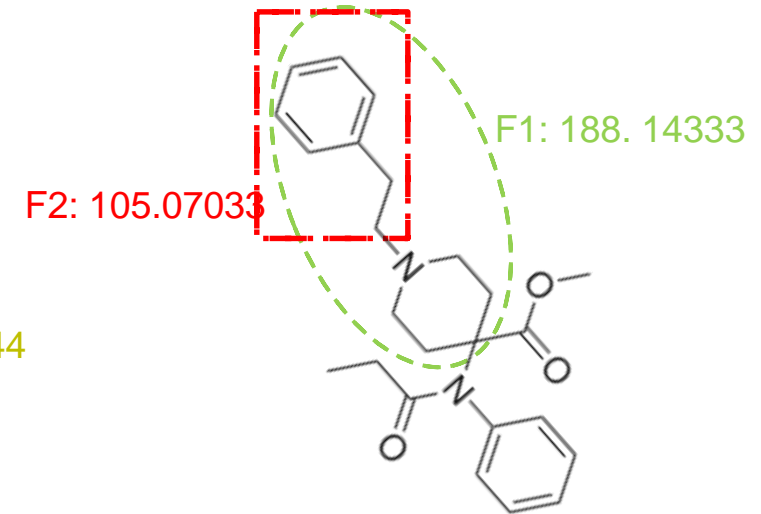
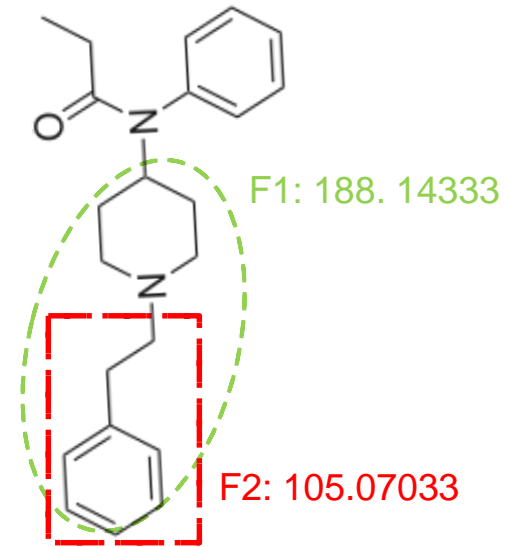
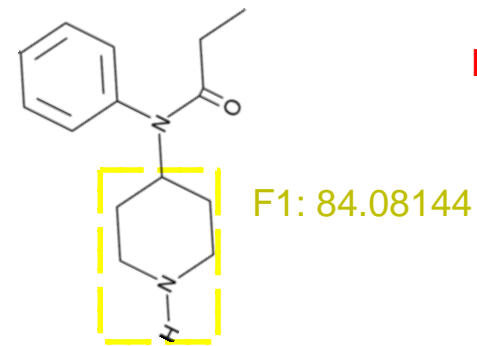
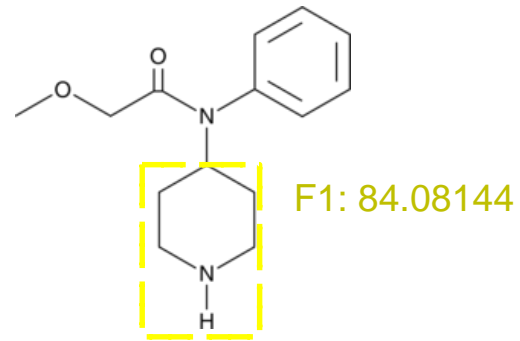
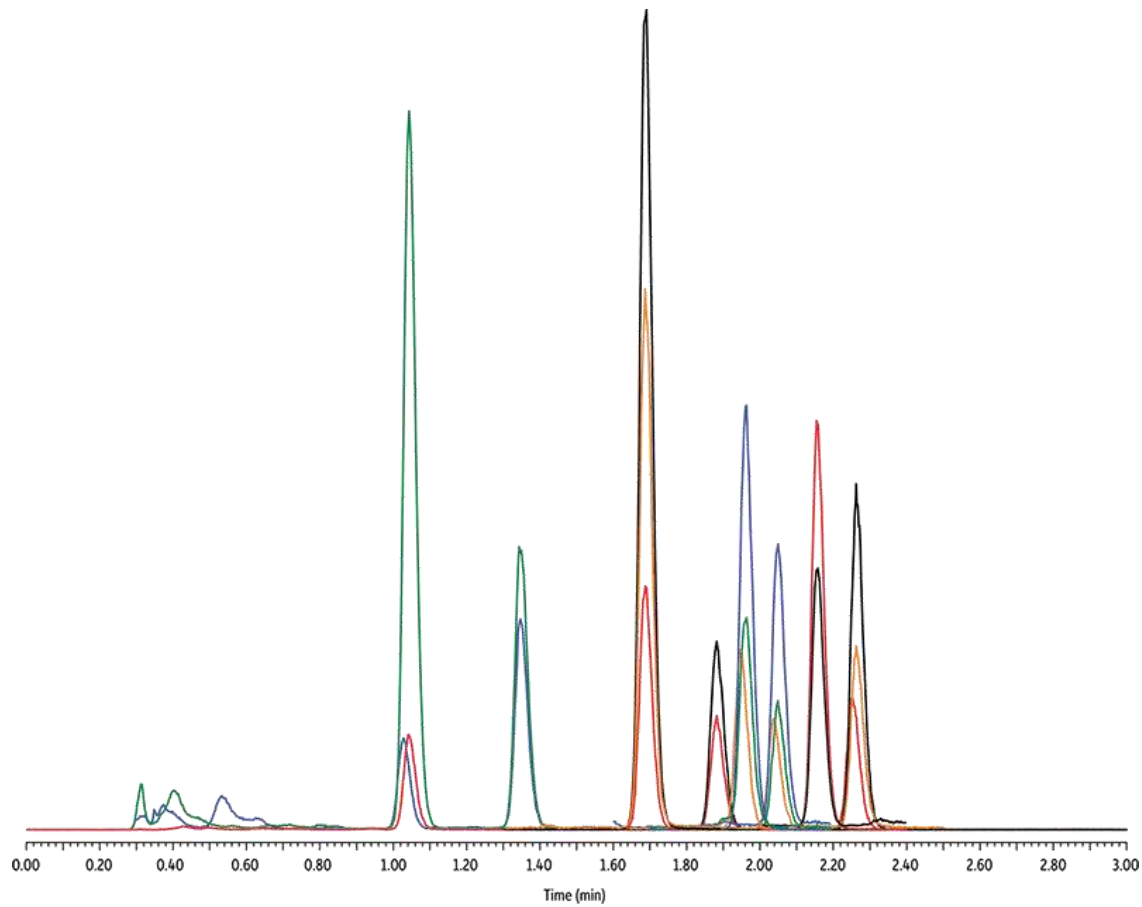
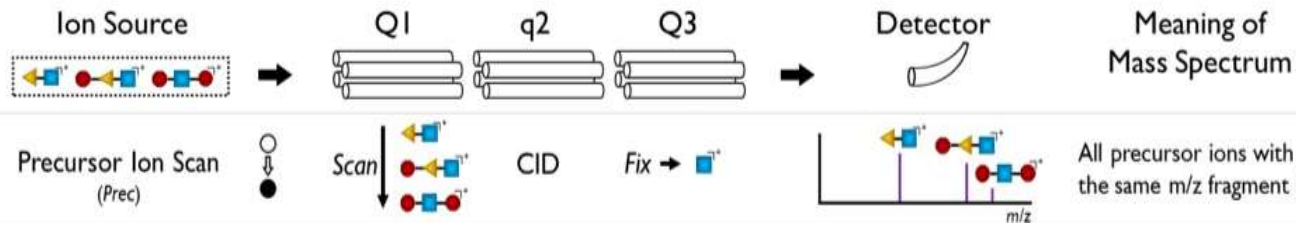


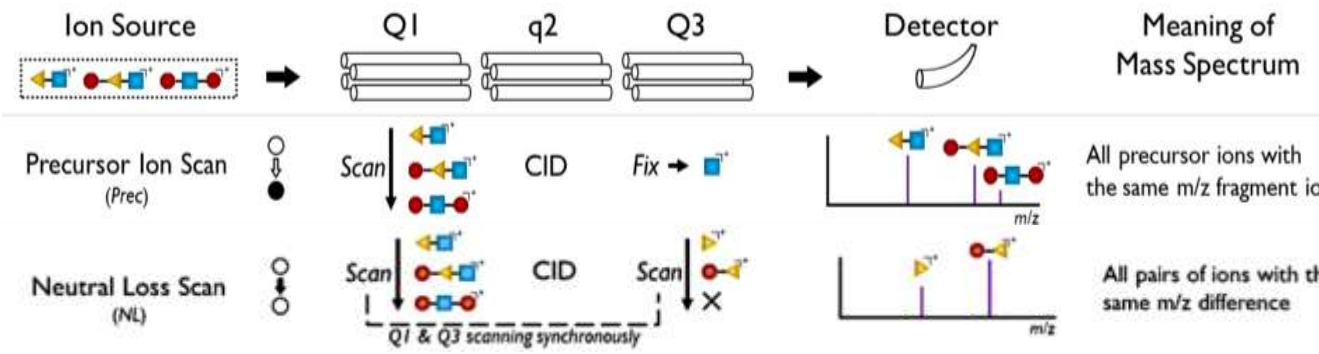
Perdita Neutra = 59 Da



Perdita Neutra = 70 Da

# HPLC-MS/MS - Applicazioni





# HPLC-MS/MS - Applicazioni

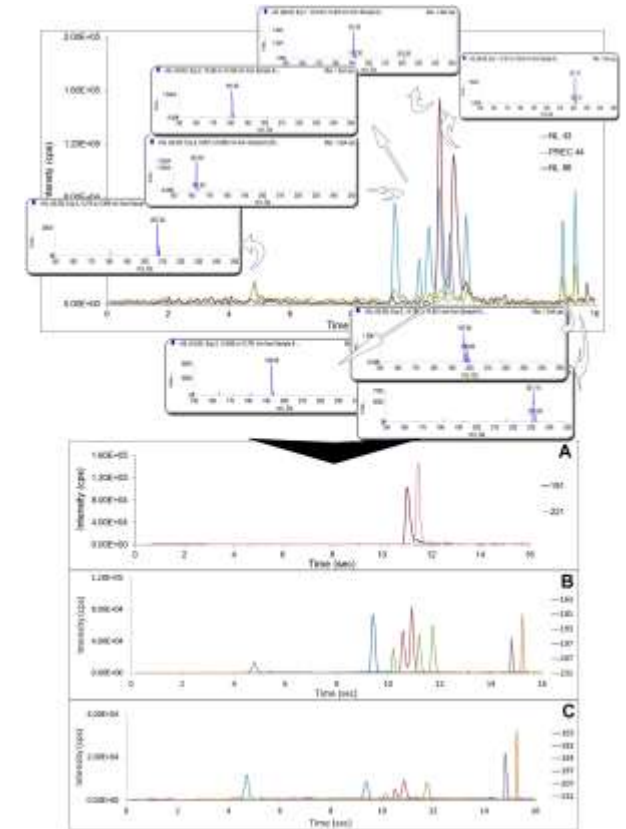
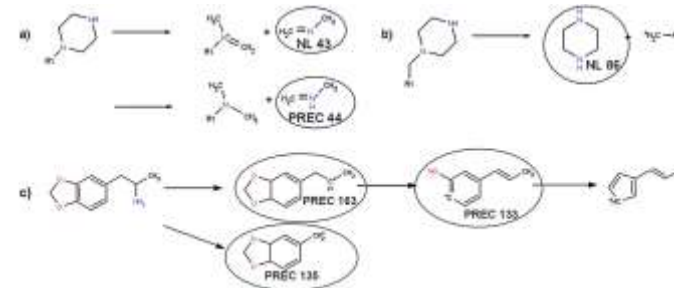
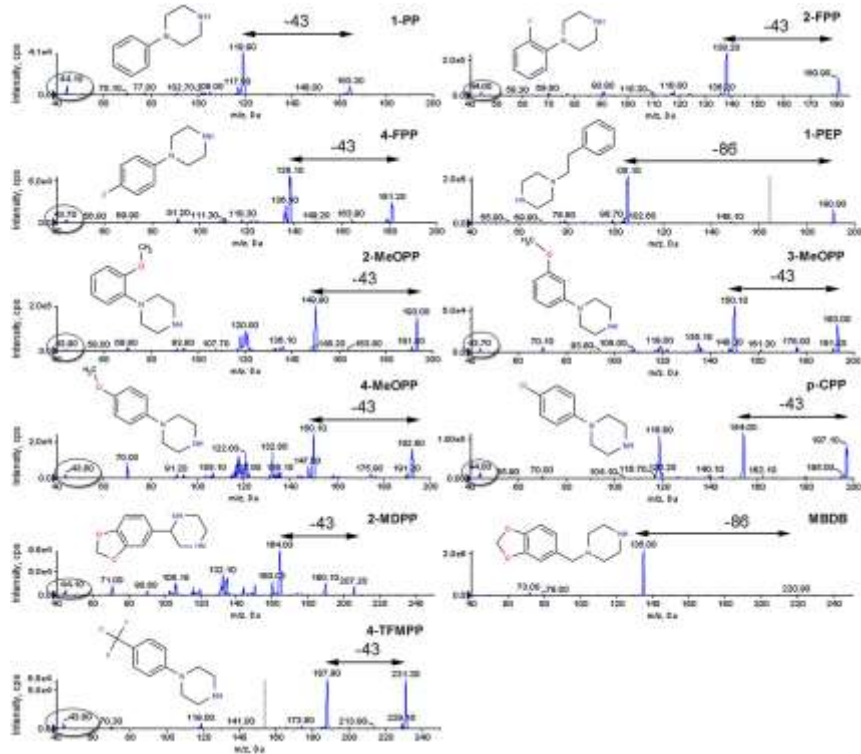
Research article

Received: 18 June 2012 | Revised: 28 September 2012 | Accepted: 29 September 2012 | Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jms.3115

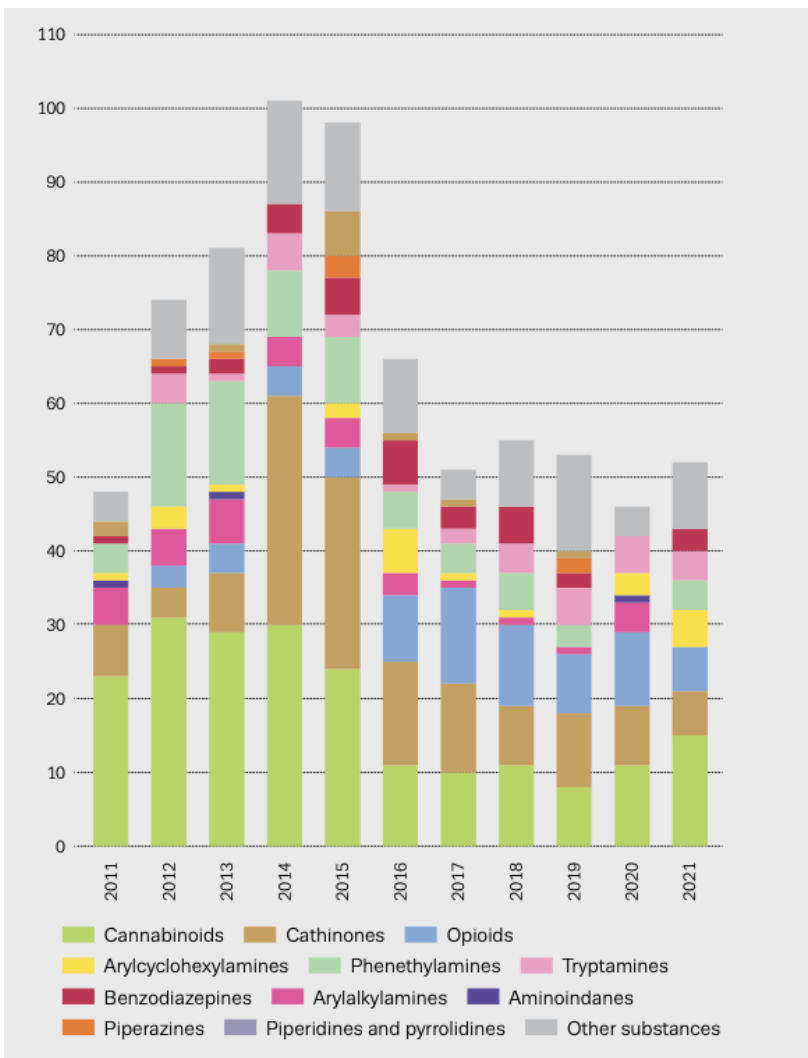
## Screening of methylenedioxyamphetamine- and piperazine-derived designer drugs in urine by LC-MS/MS using neutral loss and precursor ion scan

Camilla Montesano,<sup>a</sup> Manuel Sergi,<sup>b\*</sup> Mariaelena Moro,<sup>a</sup> Sabino Napoletano,<sup>a,c</sup> Francesco Saverio Romolo,<sup>d,e</sup> Michele Del Carlo,<sup>b</sup> Dario Compagnone<sup>b</sup> and Roberta Curini<sup>a</sup>



## Considerando la varietà di NPS continuamente immesse sul mercato, l'identificazione di nuovi composti nei sequestri o nei campioni biologici è una vera sfida

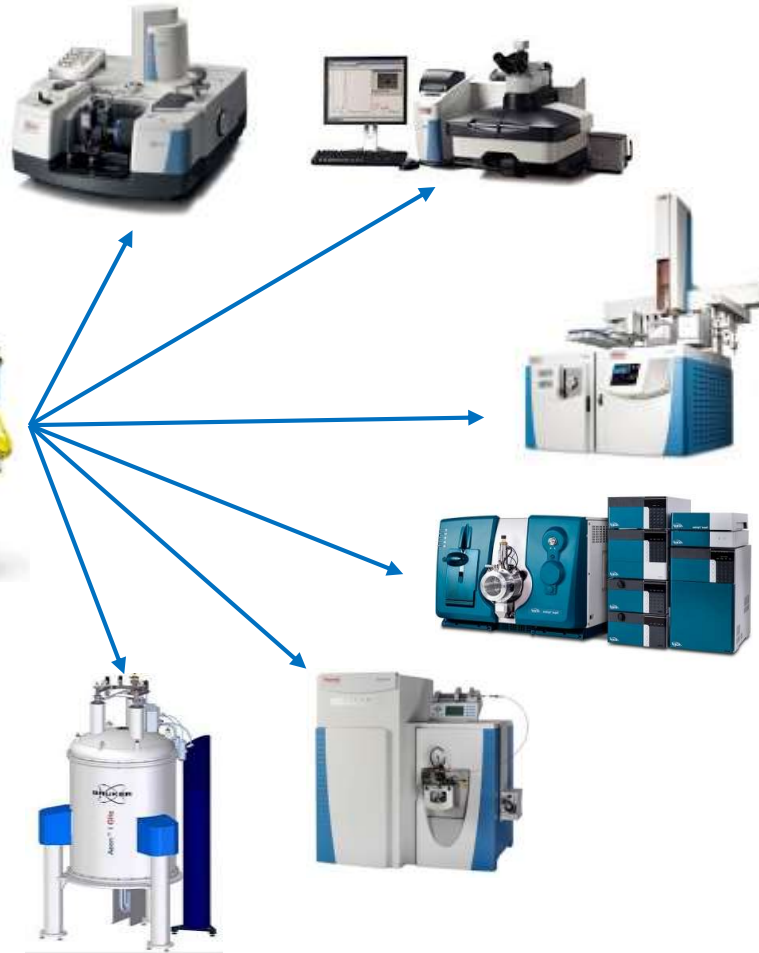
Number and categories of new psychoactive substances reported to the EU Early Warning System for the first time, 2011–21



Esempio di pericolosità dei nuovi oppioidi sintetici. In immagine sono riportate le dosi con uguale effetto sul SNC

La spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) è uno strumento essenziale per lo screening e l'identificazione di nuove NPS

Complementarietà  
delle diverse tecniche  
analitiche



## **RISULTATO**

*Espresso in termini di*

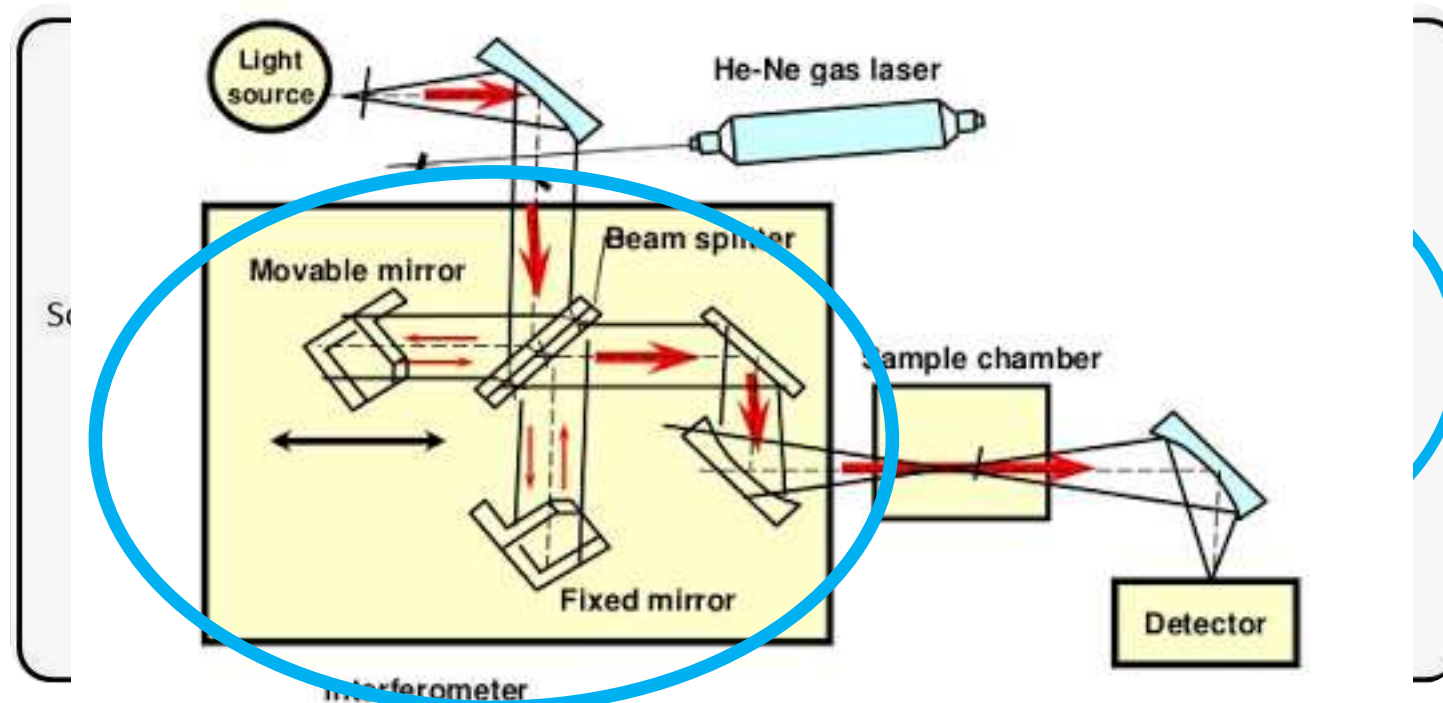
- Identificazione  
(o Caratterizzazione)
- Quantificazione





Tecnica spettroscopia di assorbimento.

Quando un fotone infrarosso viene assorbito da una molecola, questa passa dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato.



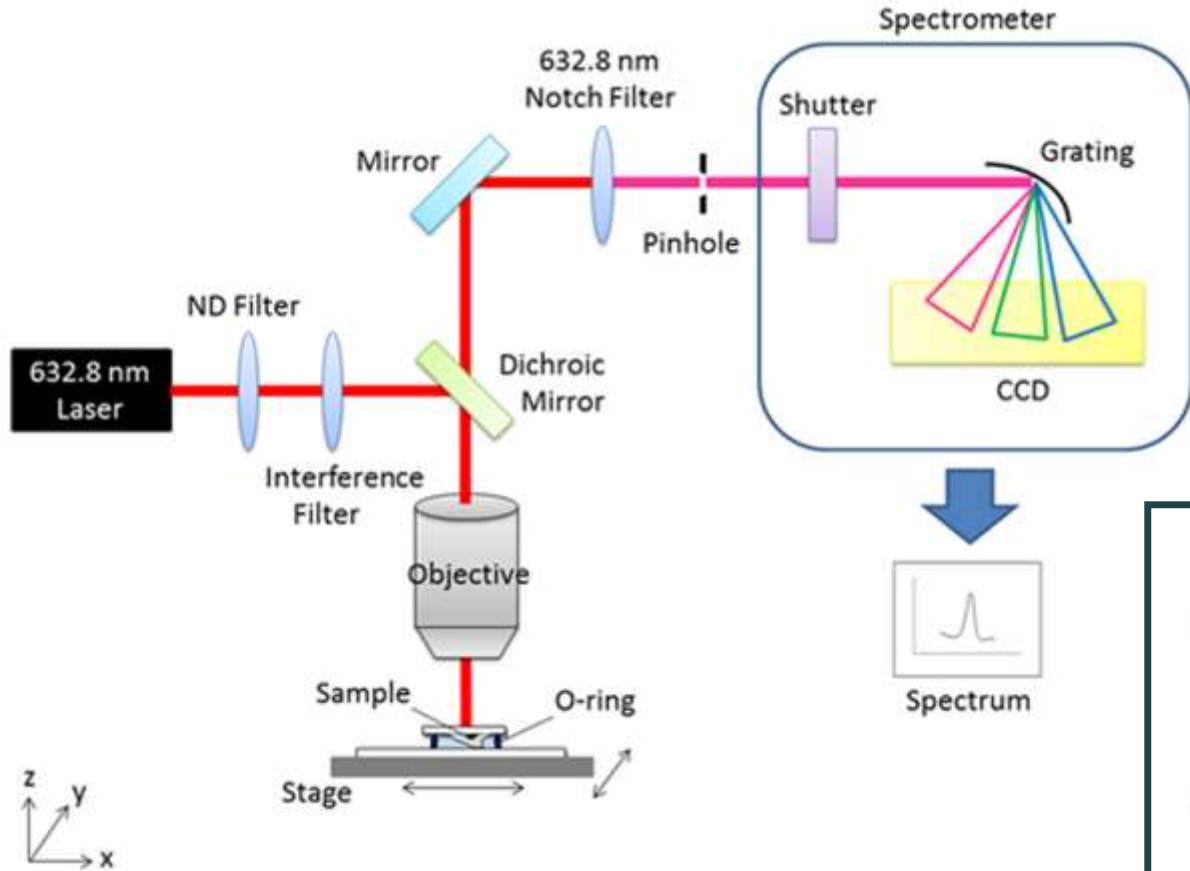
*Mentre gli spettrofotometri a dispersione misurano l'andamento del segnale nel tempo (scansione delle lunghezze d'onda), gli spettrofotometri a trasformata di Fourier registrano gli spettri in modo simultaneo alle varie lunghezze d'onda*



# Raman spectroscopy



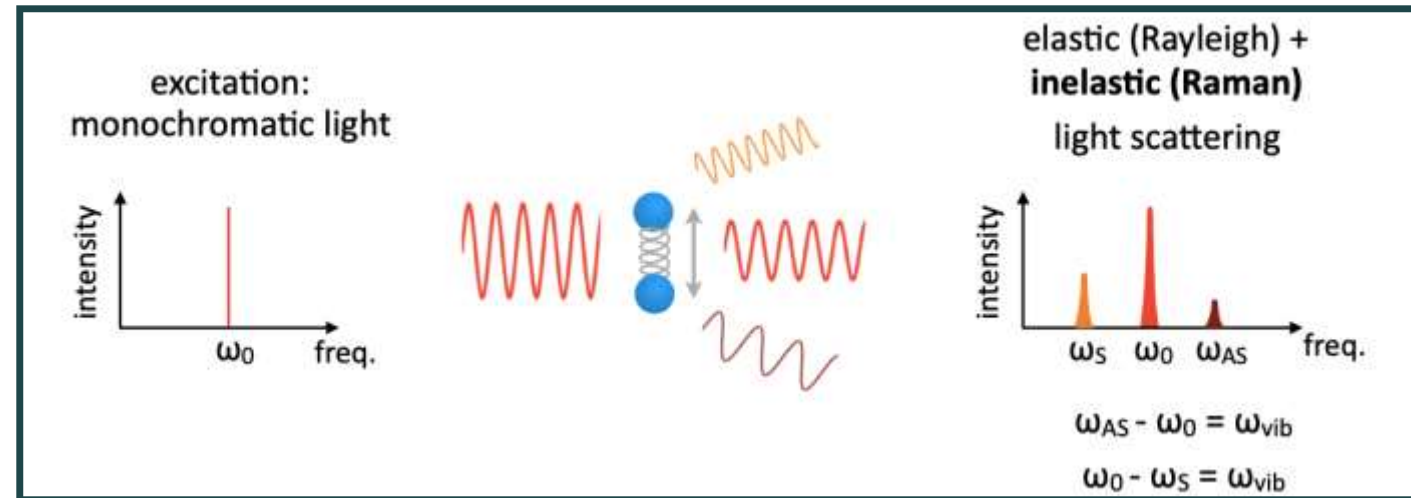
La spettroscopia di scattering Raman è una tecnica di analisi dei materiali basata sul fenomeno di diffusione di una radiazione elettromagnetica monocromatica da parte del campione analizzato.



Le **informazioni** fornite dalla spettroscopia Raman si ottengono mediante un processo di diffusione (scattering) della luce

- spettro di vibrazione (impronta digitale molecolare)
- struttura della catena dorsale molecolare e del reticolo cristallino

- ✓ Microscopio ottico
- ✓ Interferometro (FT-Raman)



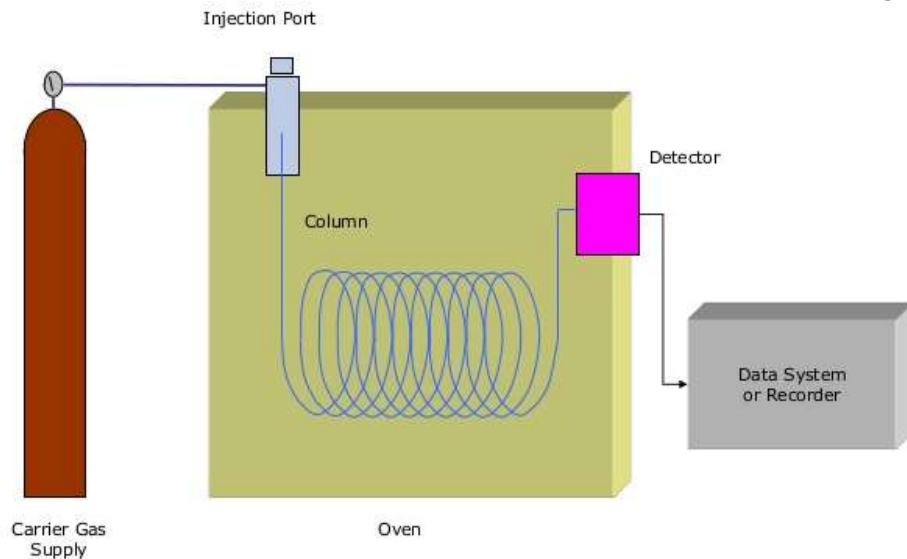
# Cromatografia e Spettrometria di Massa

Il termine **cromatografia** indica un insieme di tecniche che hanno lo scopo di separare una miscela nei suoi componenti, per permetterne il riconoscimento qualitativo e quantitativo.

## Cromatografia GASSOSA



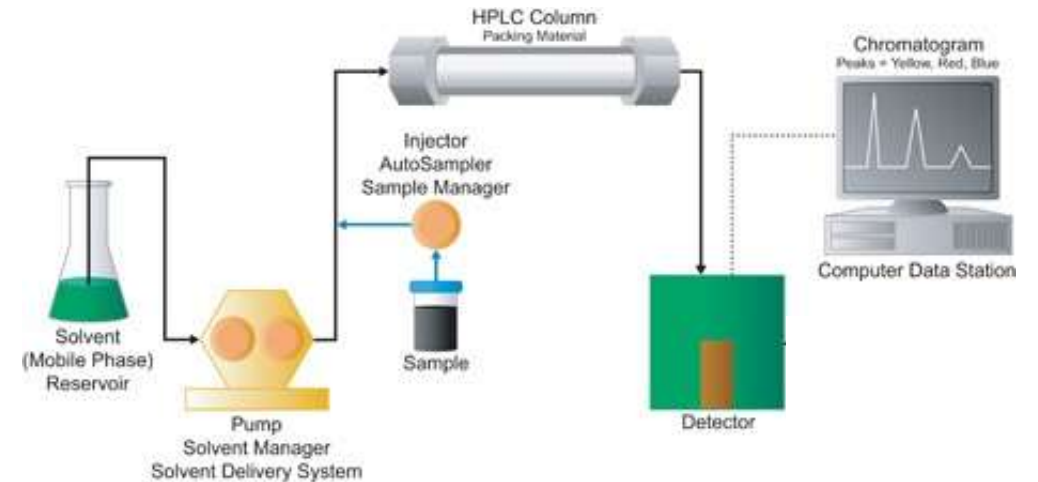
- Fase stazionaria: Film di fase inerte depositato in una colonna GC
- Fase mobile: un gas che fluisce attraverso la fase stazionaria e rappresenta la fase mobile (carrier gas).



## Cromatografia LIQUIDA

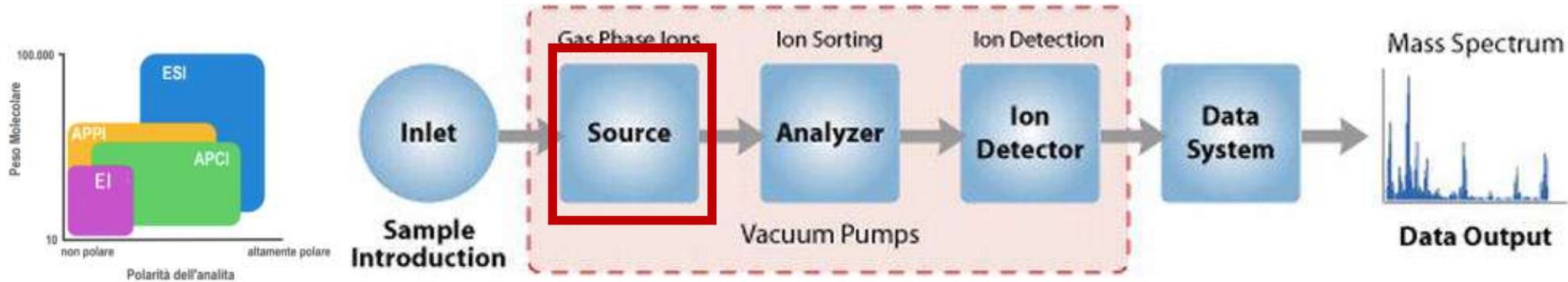


- Fase stazionaria: silice o silice funzionalizzata
- Fase mobile: Solvente (o miscele di solventi)



# Cromatografia e Spettrometria di Massa

La **spettrometria di massa** è una tecnica analitica basata sulla ionizzazione di atomi e/o molecole e la successiva rivelazione dei generati ioni gassosi in base al rapporto massa/carica ( $m/z$ ).



## 1. Gas Phase:

- Electron ionization (**EI**)
- Chemical ionization (**CI**)
- Field Ionization (**FI**)

## 2. Desorbimento: (*Non richiedono volatilizzazione: fase condensata*)

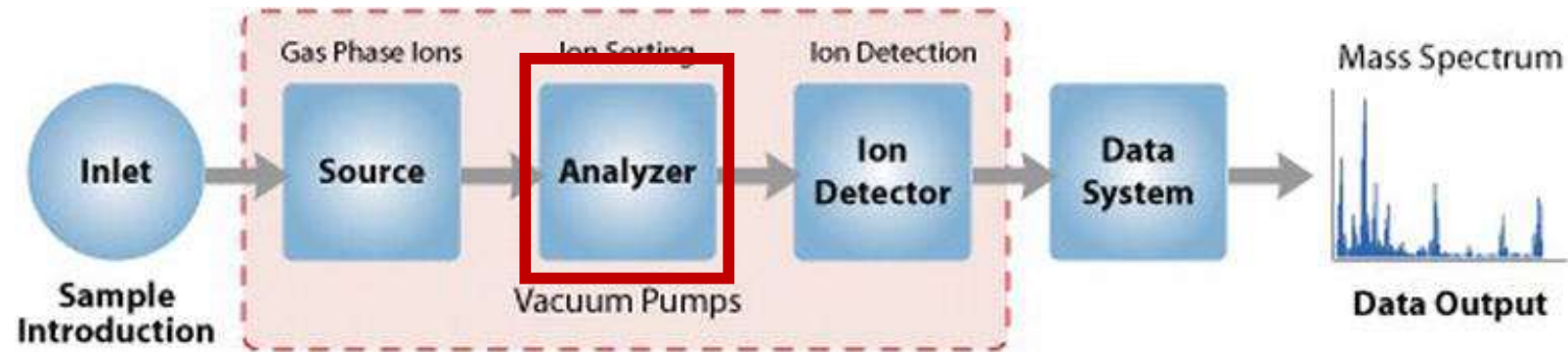
- Laser Desorption (**LD**) → MALDI
- Plasma Desorption (**PD**)
- Thermal Desorption (Thermospray)
- DESI
- DART

## 3. Nebulizzazione

- Atmospheric Pressure Chemical Ionization (**APCI**) and photoionization (**APPI**)
- Electrospray ionization (**ESI**)

# Cromatografia e Spettrometria di Massa

Consente di misurare le masse molecolari (nominali o esatte) e di ottenere dei profili di frammentazione che sono specifici per ciascun composto quindi permette di effettuare il riconoscimento di una sostanza nota, di individuare la formula di struttura di composti incogniti, di ottenere informazioni strutturali.



<b><i>Analizzatore</i></b>	<b><i>Simbolo</i></b>	<b><i>Principio di separazione</i></b>
Electric sector	E or ESA	Kinetic energy
Magnetic sector	B	Momentum
Quadrupole	Q	m/z (trajectory stability)
Ion trap	IT	m/z (resonance frequency)
Time-of-flight	TOF	Velocity (flight time)
Fourier transform ion cyclotron resonance	FTICR	m/z (resonance frequency)
Fourier transform orbitrap	FT	m/z (resonance frequency)

## ***MS***

Consente di misurare le masse molecolari (nominali o esatte)

## ***Massa Tandem MS/MS***

Si possono effettuare esperimenti di MS/MS sfruttando in serie due spettrometri di massa tra i quali si inserisce una cella di collisione

**TRANSIZIONI IONE  
PRECURSORE / IONE  
FRAMMENTO**

## LC-HRMS è attualmente la tecnica di elezione per l'analisi di NPS

- Maggiore potere identificativo rispetto a MS tradizionale
- L'uso di strategie informatiche rende più facile l'identificazione di nuove sostanze
- Limite per nuove sostanze che non rientrano nelle classi note

### Analisi Target e suspect screening

Possibilità di reinterrogare i campioni analizzati

Si tratta di uno screening limitato alle sostanze presenti nella libreria, inadatto alla rivelazione ed identificazione di nuove droghe

### Analisi non target

Possibilità di identificare (putativamente) nuove sostanze

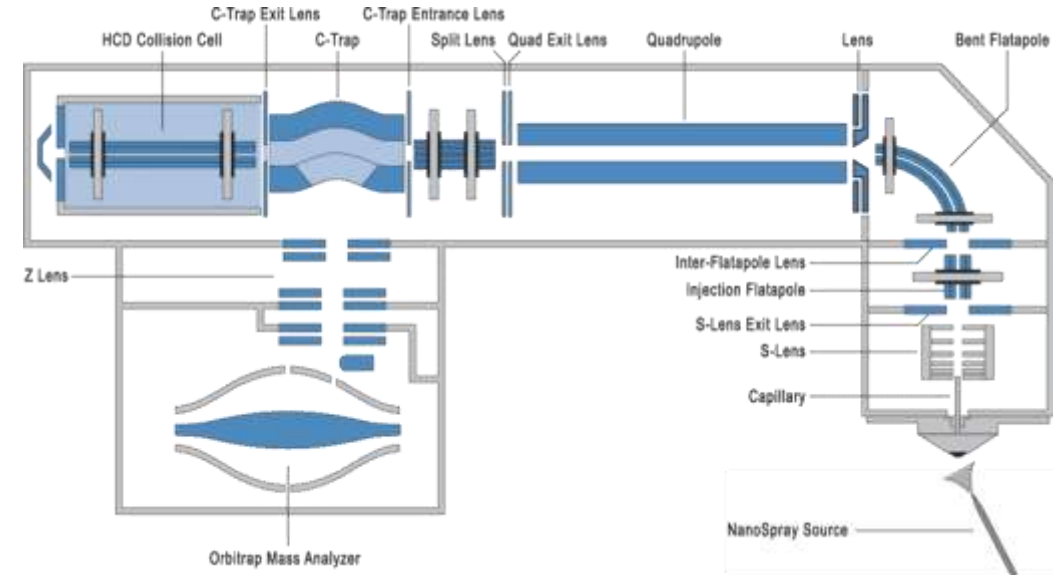
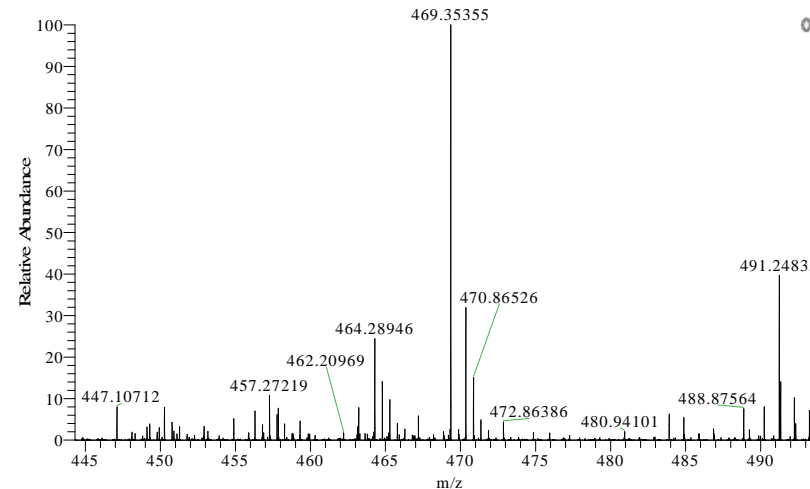
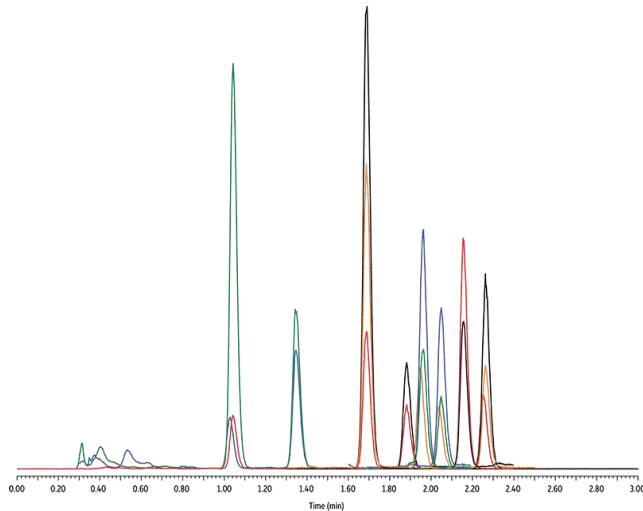
Possibilità di applicare diverse strategie informatiche post-acquisizione

Condivisione online dei dati spettrali di nuove sostanze individuate



## Identificazione:

- ✓ Tempo di ritenzione
- ✓ Spettro di massa
  - Delta di Massa (massa esatta massa accurata)
  - Massa accurata dello ione parent
  - Massa accurata dei frammenti
  - Rapporto tra le intensità dei frammenti

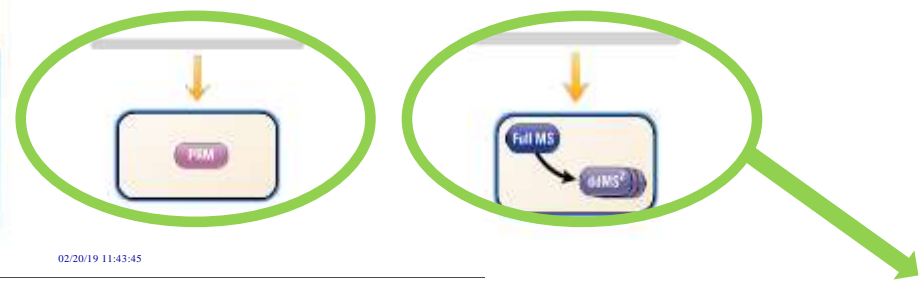


## Modalità di Acquisizione:

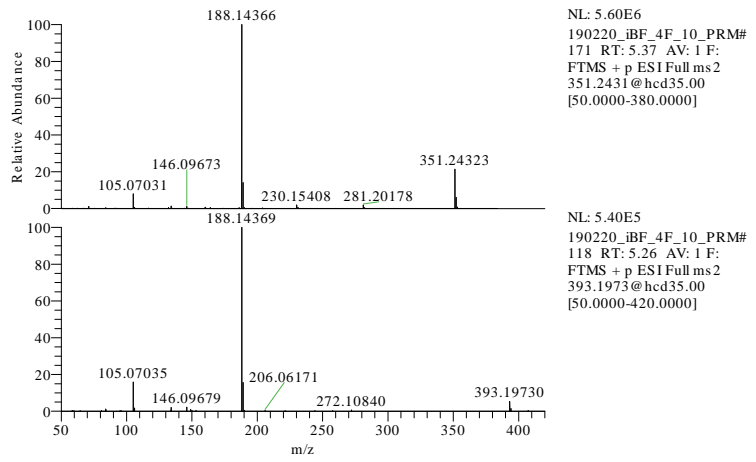
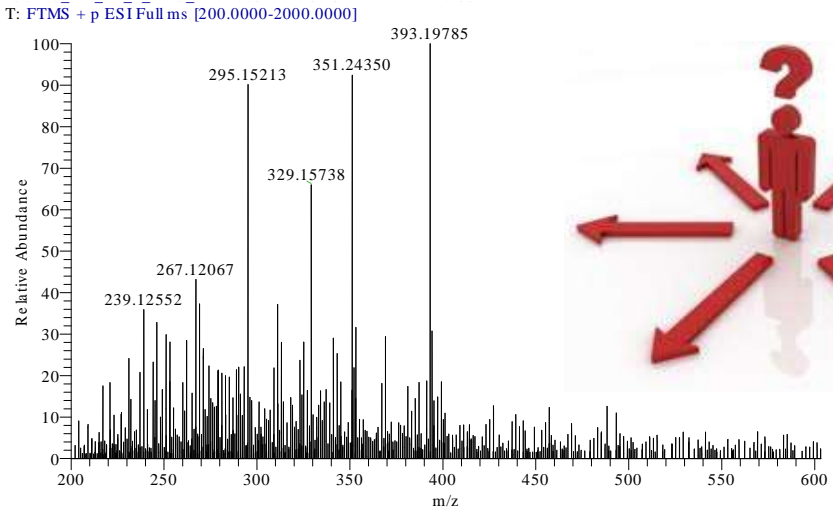
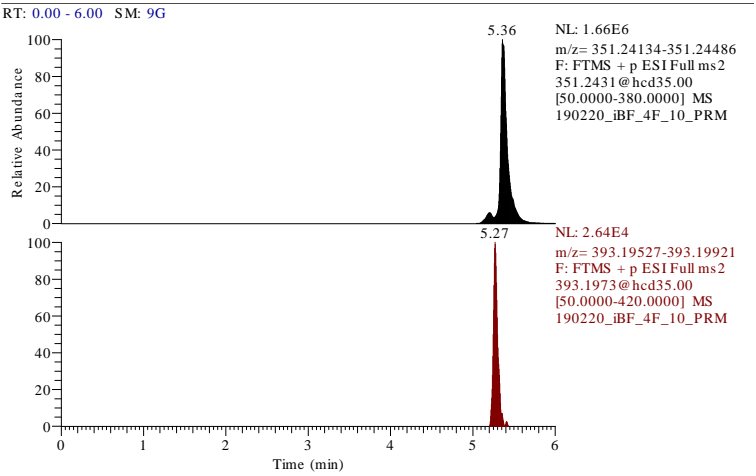
- ✓ Full Scan
- ✓ HRMS/MS
- ✓ Data-Dependent Scan (FS-ddA)
- ✓ Selected Ion Monitoring

**Targeted, Semi-Targeted, Suspect, Untargeted**





D:\PRATICH...190220\_iBF\_4F\_10\_PRM 02/20/19 11:43:45



**Chromatogram overlay**

**Selected compound spectra**

**Results tables**

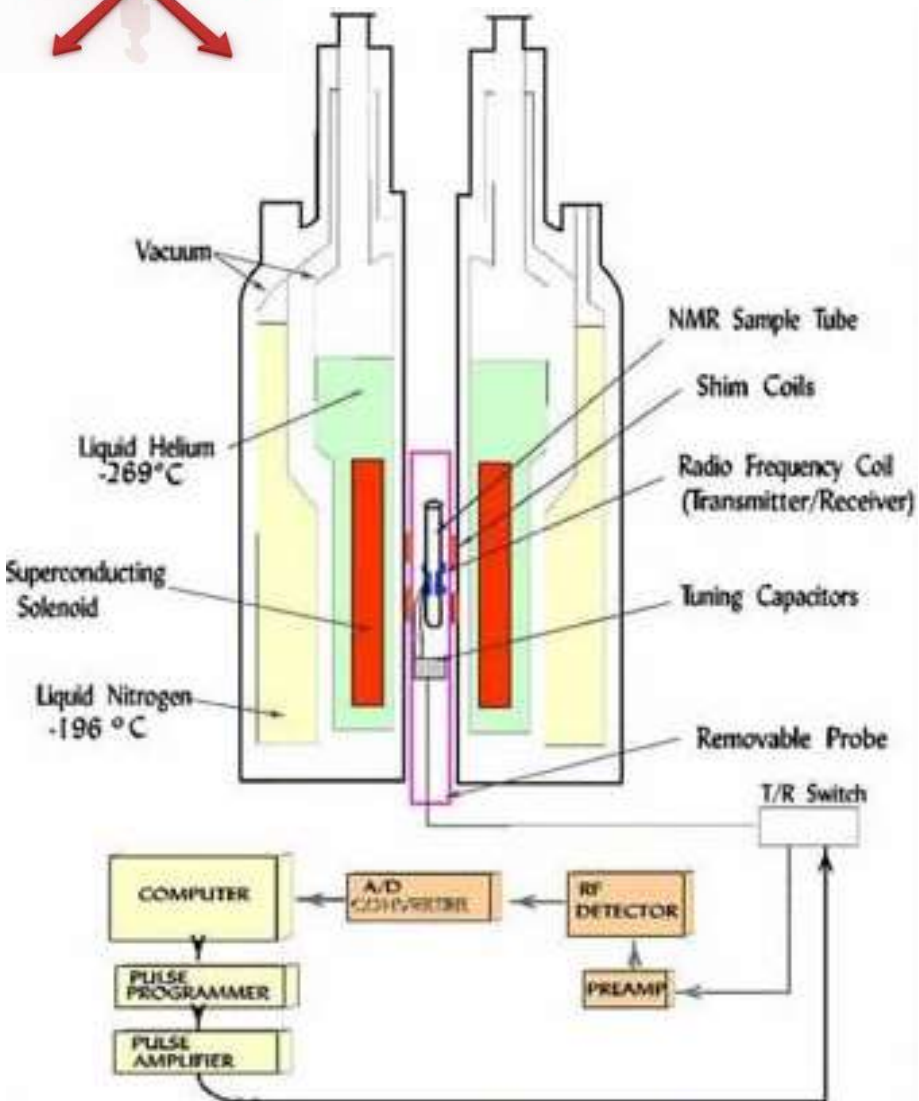
Compound	Name	Formula	Molecular Weight	Retention Time (min)	Abundance	Score	Log P	Charge	Other
1	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000
2	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000
3	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000
4	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000
5	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000
6	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000
7	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000
8	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000
9	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000
10	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000
11	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000
12	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000
13	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000
14	Phenacetin	C10H13NO2	179.20	5.37	100	1000	1.91	0	1000

**Current compound selection**



# Nuclear magnetic resonance spectroscopy - NMR

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare è un metodo spettroscopico basato sulle proprietà magnetiche dei nuclei di alcuni atomi e isotopi.



## Principio del metodo:

- Campione immerso in un forte campo magnetico (orientamento spin nucleari con il campo)
- Impulsi a radiofrequenza producono un eccesso di nuclei eccitati
- Segnale emesso dai nuclei degli atomi i cui nuclei tornano all'equilibrio (FID)
- Applicazione della trasformata di Fourier (deconvoluzione spettro)

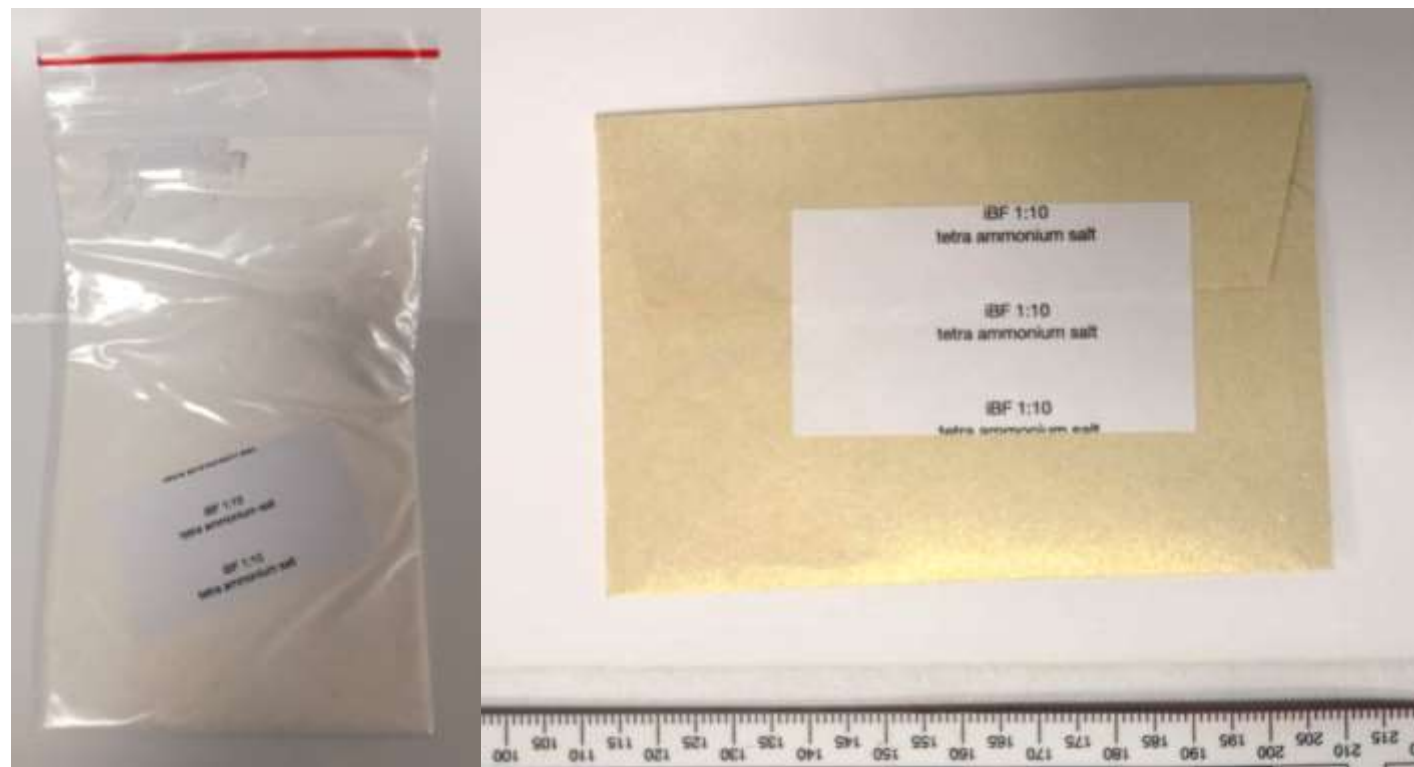
$^1\text{H}$

$^{13}\text{C}$

Dicembre 2019

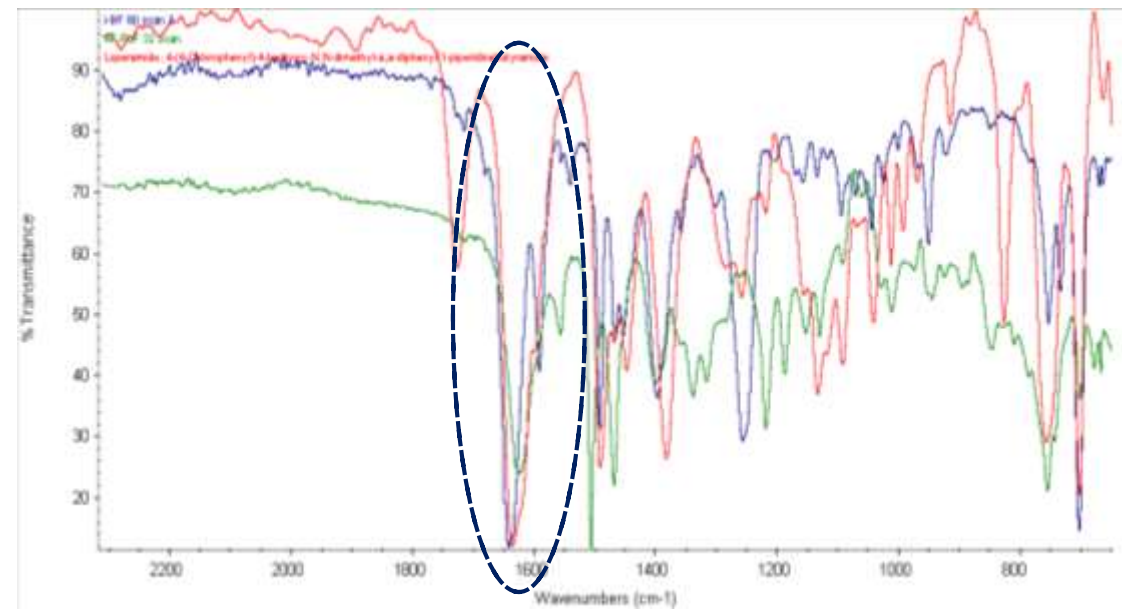
Nord Italia

Sequestro di una spedizione postale da mittente già precedentemente attenzionato

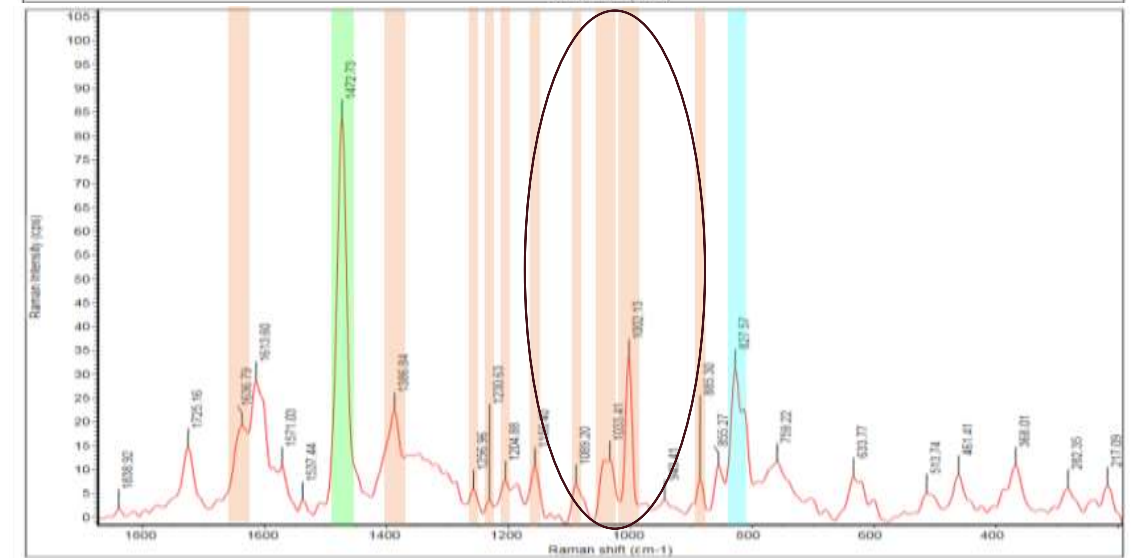
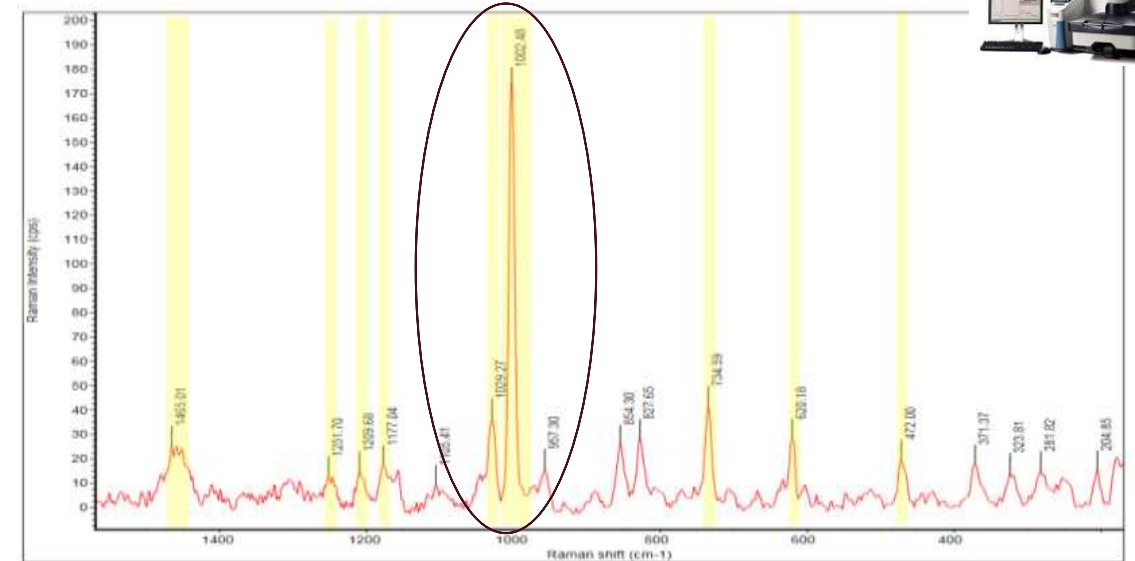
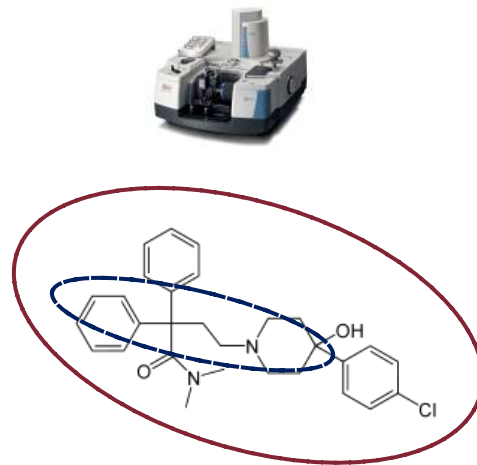
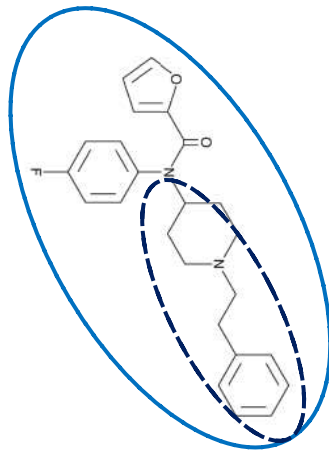
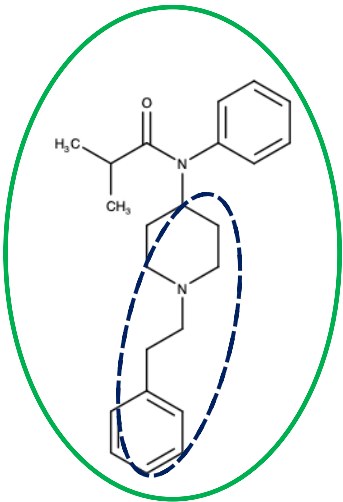


La confezione della spedizione riporta una etichetta che suggerisce la presenza di un derivato del fentanyl

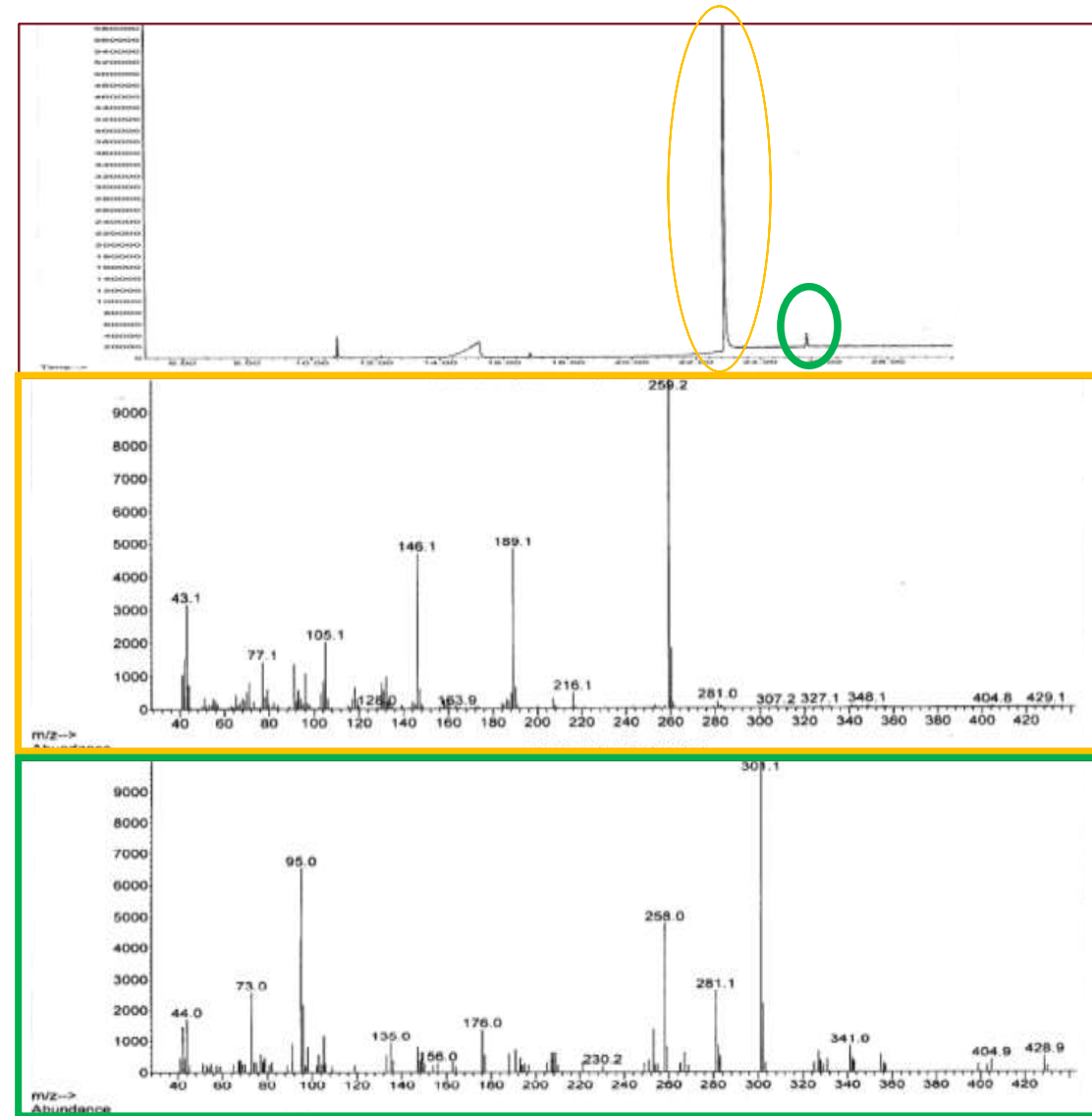
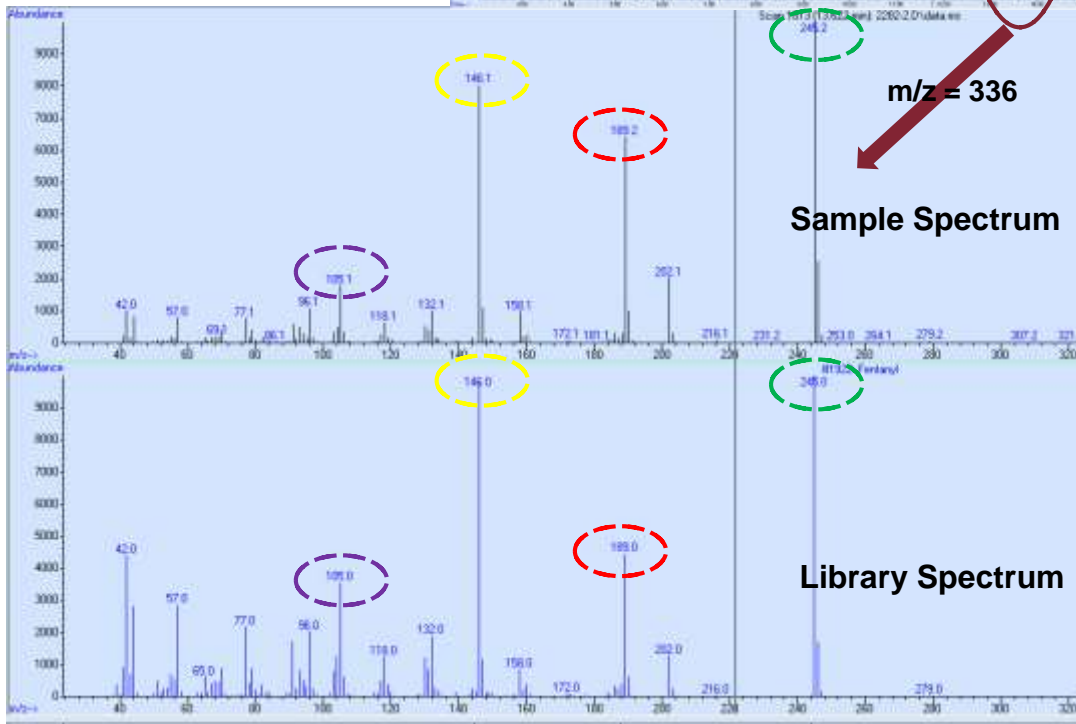
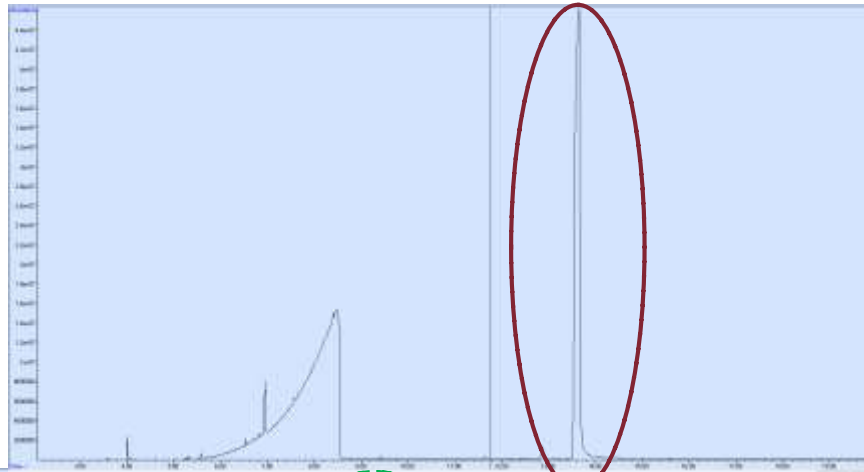
# Tecniche spettroscopiche



IR spectra of Furanyl Fentanyl (Blue), Isobutyryl Fentanyl (Green) and Loperamide (Red)

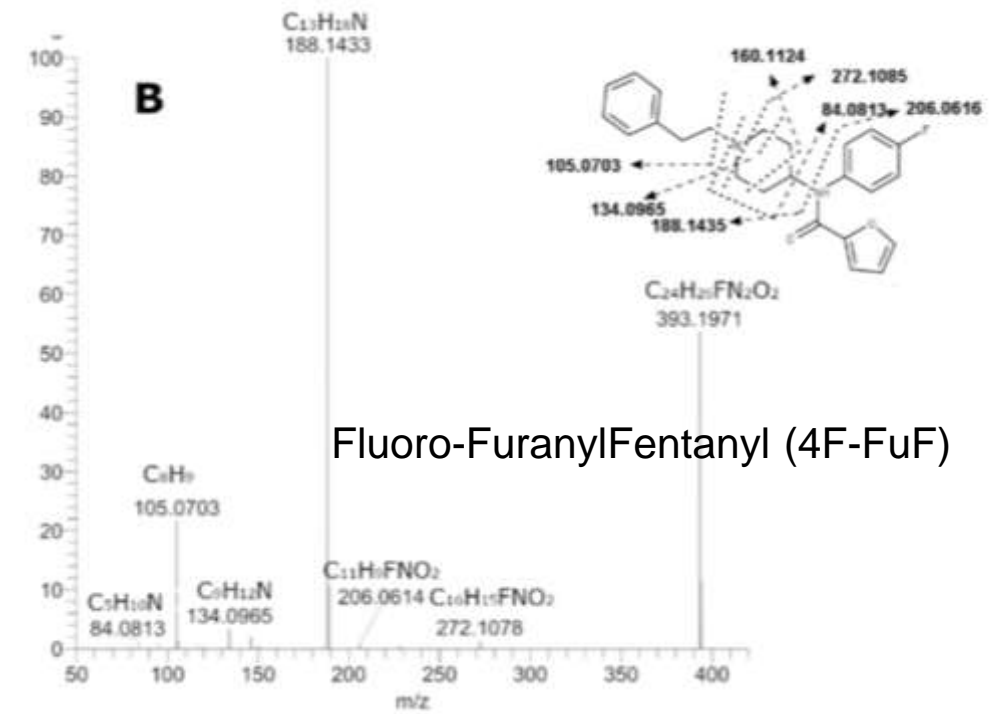
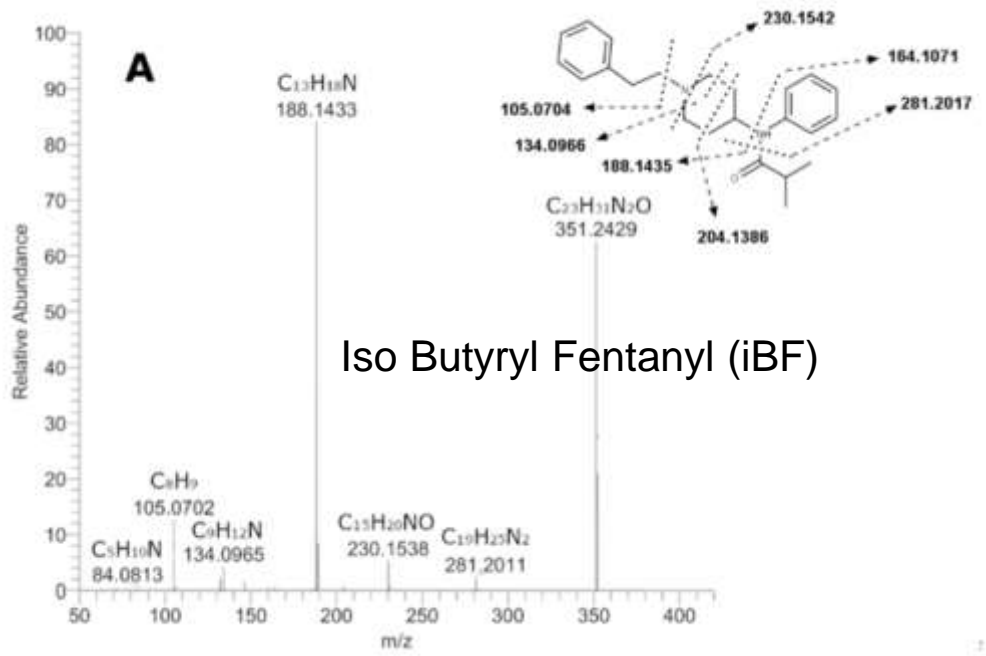
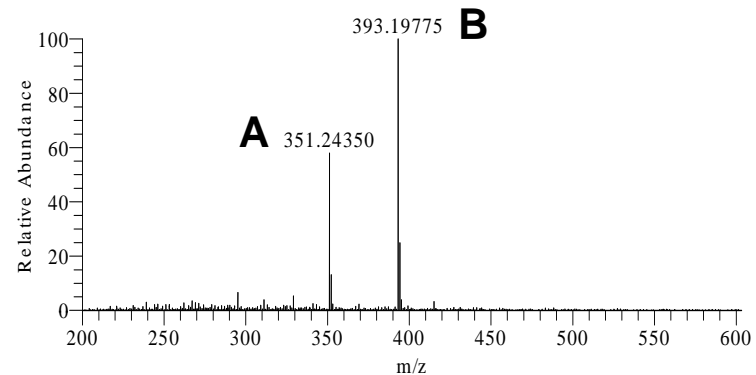
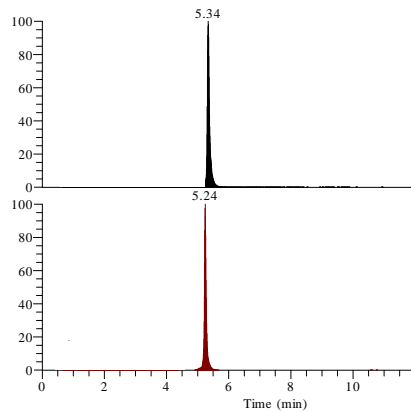


# Analisi GC-MS

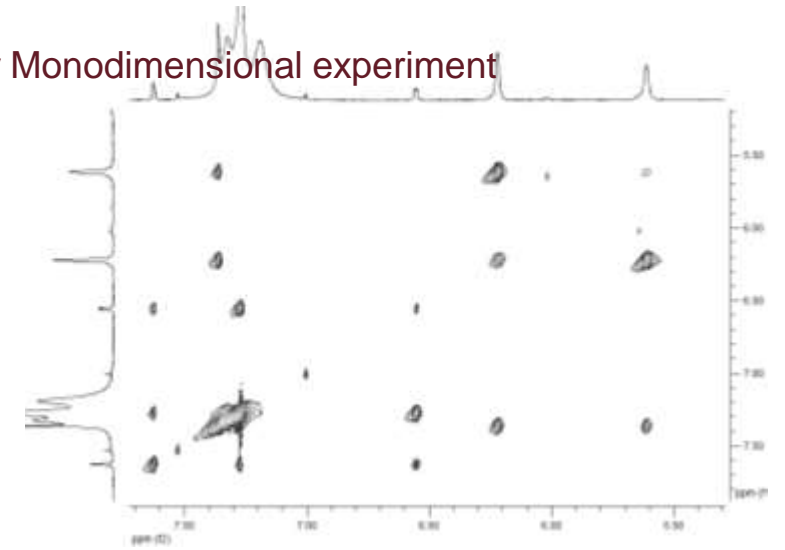




# Analisi HPLC-HRMS/MS

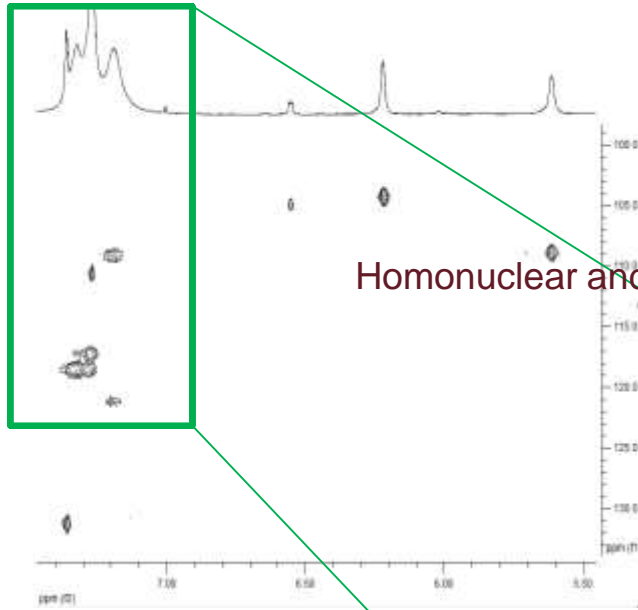


Homonuclear Monodimensional experiment

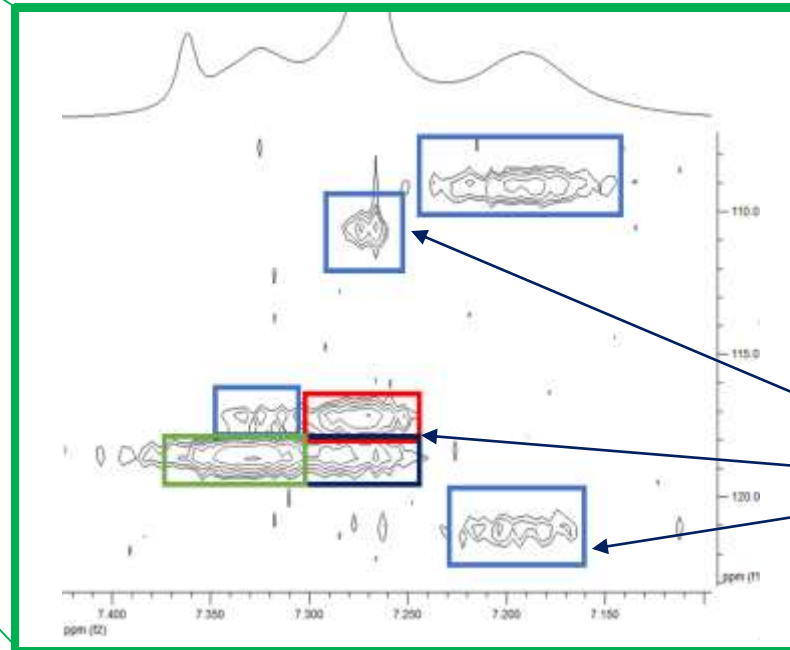


$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY spectrum of 4F-FuF

Homonuclear and Heteronuclear Bidimensional experiment



$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectrum of 4F-FuF



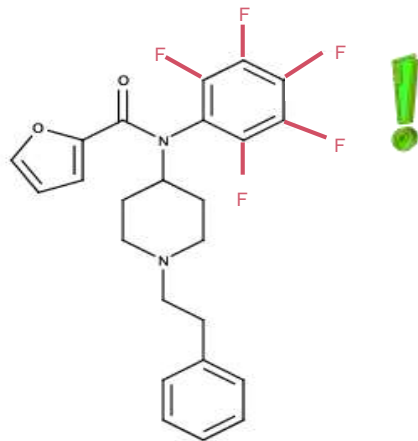
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectrum of 4F-FuF (enlargement). In the picture are evidenced the seven (7) non-equivalent CH groups belonging to 6 terms aromatic rings.

resonances

STRUCTURE



# HighResNPS



## HighResNPS

HighResNPS.com is a crowd-sourced mass spectral database for HR-MS screening of New Psychoactive Substances (NPS).

The database can be used for direct searches on compound names and exact mass of precursor and/or fragment ions. Also, the database can be downloaded and converted to a suspect library for **Agilent** QTOF MS, **Bruker** QTOF MS, **Waters** QTOF MS, **Sciex** QTOF MS, **Thermo** Orbitrap MS and **Shimadzu** QTOF MS.

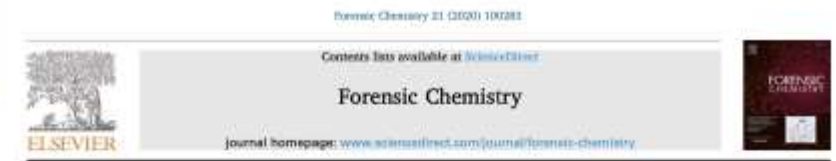
HighResNPS.com currently contains more than **6,200** entries (where more than **2,200** entries are unique).

HighResNPS.com is only intended for a closed user group and not open to the general public.



Aggiornamento  
Giugno 2021

*Risultato*



## Multi-analytical characterization of 4-fluoro-furanyl fentanyl in a drug seizure

Flaminia Vincenti<sup>a,b</sup>, Flavia Pagano<sup>c</sup>, Camilla Montesano<sup>a,c</sup>, Fabio Sciubba<sup>a</sup>, Maria Enrica Di Cocco<sup>a</sup>, Adolfo Gregori<sup>d</sup>, Fabiana Di Rosa<sup>d</sup>, Livia Lombardi<sup>e</sup>, Manuel Sergi<sup>c</sup>, Roberta Curini<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Sapienza University of Rome, Department of Chemistry, 00185 Rome, Italy

<sup>b</sup> Sapienza University of Rome, Department of Public Health and Infectious Disease, 00185 Rome, Italy

<sup>c</sup> University of Teramo, Faculty of Bioscience and Technology for Food, Agriculture and Environment, 64100 Italy

<sup>d</sup> Carabinieri, Department of Scientific Investigation (DIS), 00191 Rome, Italy

### ARTICLE INFO

Keywords:  
Fentanyl  
IR  
Mass spectrometry  
GC-MS  
LC-MS/MS, NMR

### ABSTRACT

In recent years, the synthesis and introduction of Novel Psychoactive Substances (NPS) into the illicit market has reached alarming levels. More than 730 compounds have been identified by the European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Among the newest NPS, synthetic opioids deserve special attention, in particular fentanyl and its analogues that in 2018 covered more than 70% of the world demand for opioids, with thousands of fatal events in USA. In this context it is of significant importance to have the right tools to identify the most recent NPS exploiting the synergy between different analytical techniques.

Two synthetic opioids, belonging to the family of fentanyl derivatives were found in the same seizure occurred in Italy in 2018, Isobutyrylfentanyl (IBF) and 4-Fluoro-Furanylfentanyl (4F-FuF) were identified. A comprehensive elucidation of 4F-FuF by means of several analytical techniques, namely IR, Raman, GC-MS, LC-MS/MS and NMR, is provided in this work.

In Italy, as a result of the present study, a formal notification of 4F-FuF to the national early warning system was sent and notification to EMCDDA ensued.

# Identificazione del Patway metabolico di una sostanza

## In Silico



Informazioni preliminari  
Metaboliti putativi

## In Vitro



Il metabolismo vero e proprio viene simulato per selezionare i prodotti più probabili

## In Vivo



Conferma delle informazioni ottenute da silici e vitro

Tutti i campioni sono analizzati e processati assieme.

### PRO:

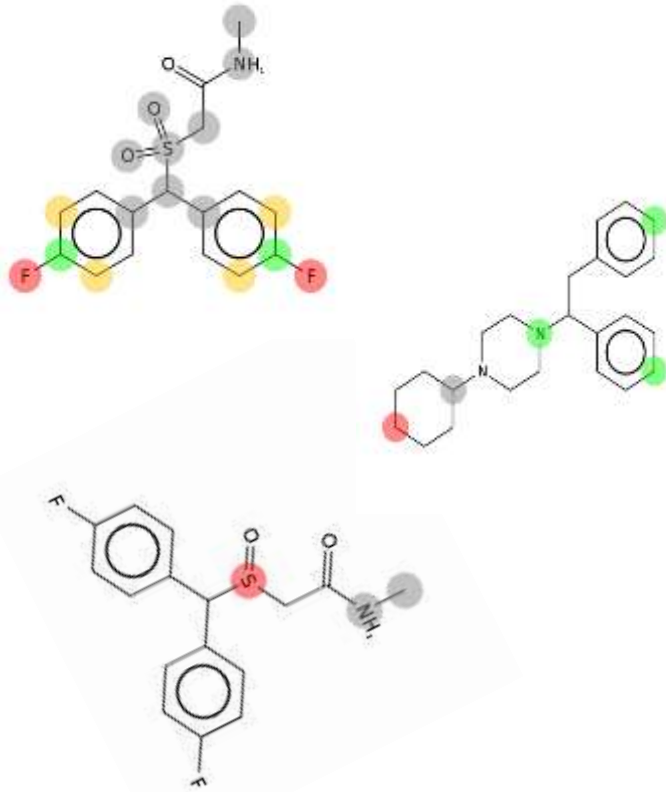
- Non trascurare nulla
- Informazione più ricca possibile
- Non escludo risultati frutto di uno solo dei passaggi

### CONTRO:

- Più l'informazione è ricca più è complessa la sua elaborazione



**UHPLC-HRMS/MS**



Molti studi si avvalgono di programmi di chimica computazionale con lo scopo di riuscire a trovare le masse sulle quali concentrare l'indagine;

La tecnica principe per l'identificazione dei metaboliti è la cromatografia, gas o liquida, accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS o LC-MS), bisogna prima di tutto conoscere la massa degli analiti.

Sono stati usati molti programmi allo scopo, ma quelli più utilizzati sembrano essere Meteor e MetaSite. Questi programmi vengono configurati in modo da coprire tutti i possibili pathway metabolici che una molecola può intraprendere, arrivando anche a superare il centinaio di composti.

Una volta trovati i derivati metabolici se ne calcolano le masse, che andranno ricercate con gli opportuni analizzatori.

Colore assegnato	Valori di NOR
ROSSO	0,66 < NOR < 1
ARANCIO	0,33 < NOR < 0,66
VERDE	0,15 < NOR < 0,33
BIANCO	0 < NOR < 0,15
GRIGIO	Pochi dati





**500  $\mu$ l**  
 **$1 \times 10^6$  cell/ml**  
**20  $\mu$ M**



- Blank incubation sample
- Positive incubation sample (Morfina)
- 6 topi per iBF + 6 topi per 4F-FuF



UHPLC-HRMS/MS



Prelievo surnatante



15000g 5 min



Il campione viene preparato partendo da una soluzione della sostanza da analizzare, stabilizzando il pH mediante tamponi.

Si utilizzano cellule microsomiali o cellule epatiche

Tempi di prelievo, solitamente si tende ad avere 3 o 4 tempi, si utilizzano composti di controllo per verificare l'effettiva attività delle cellule.

Gli epatociti vengono allora immersi nel medium.

## ➤ Spettrometro di Massa: Q-Exactive-Orbitrap Thermo Fisher Scientific

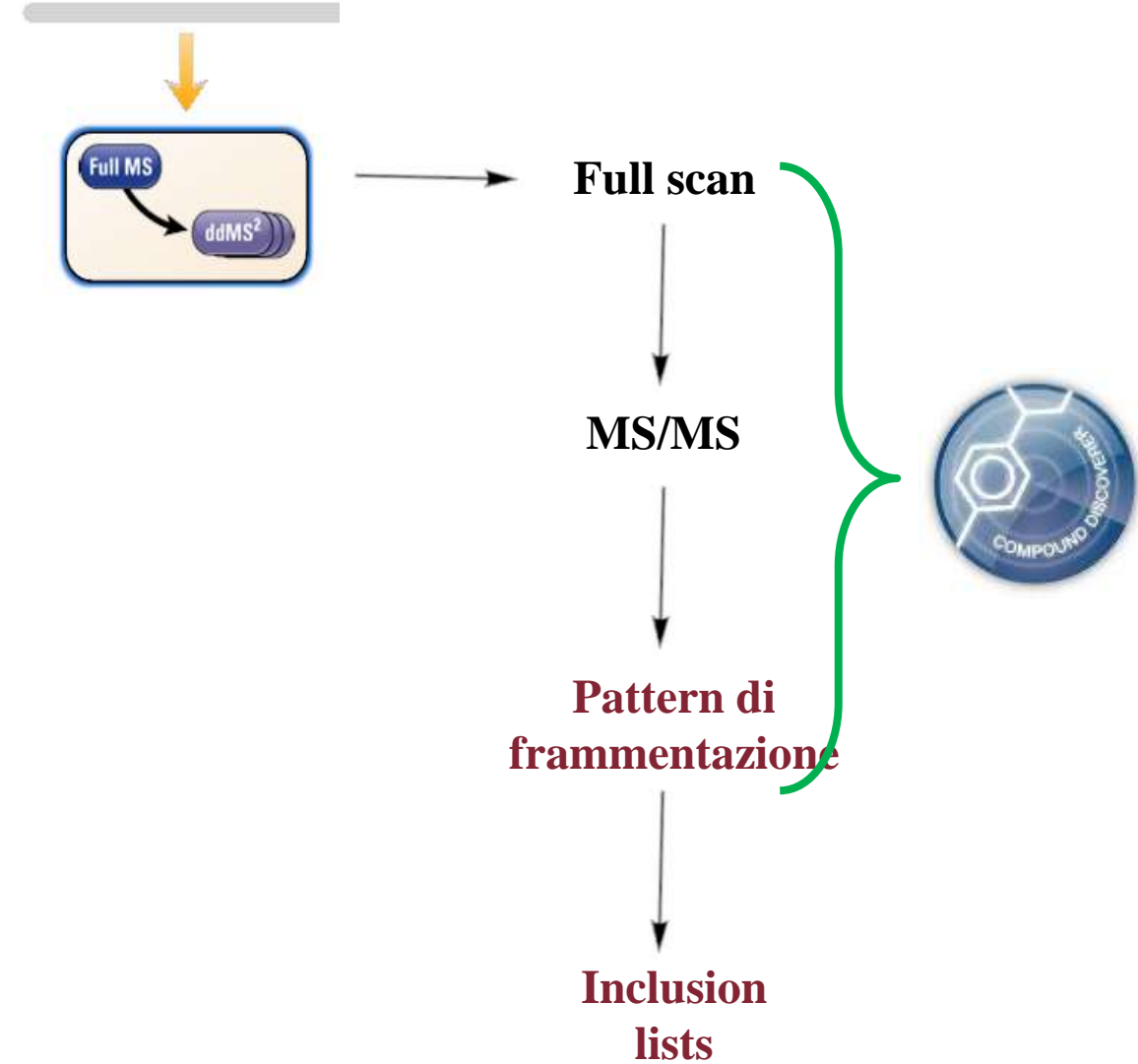


### ➤ Sorgente: H-ESI

Condizioni operative sorgente H-ESI:

- Polarity: Positive
- Spray Voltage: 3.30 kV
- Capillary temperature: 320 ° C
- H-ESI temperature: 320 ° C
- Sheat gas (Nitrogen) 55 unit
- Auxiliary gas 20 unit

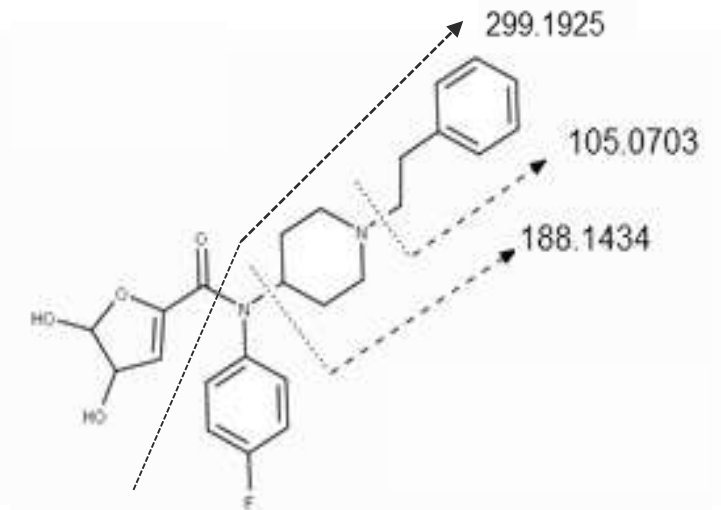
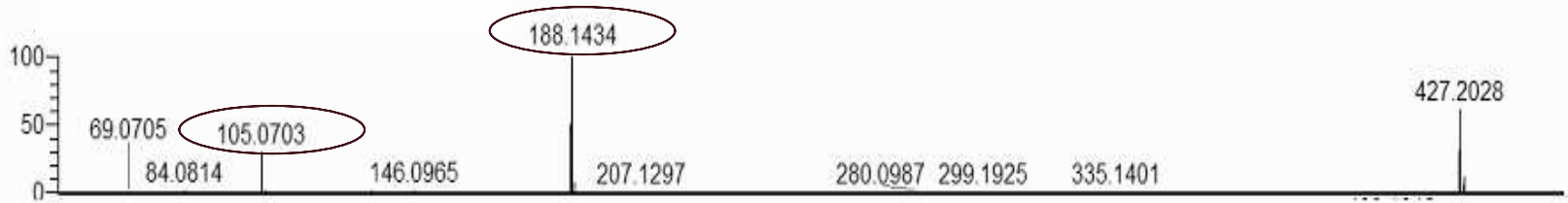
- **Colonna:** ACE Excel 2 C18-PFP 100 x 2.1 mm (1.6 um particles)
- **Fasi:**
  - A** H2O 0,1% HCOOH 10mM NH4COOH
  - B** 50:50 MeCN: MeOH 0,1% HCOOH
- **Flusso:** 0.500 mL/min



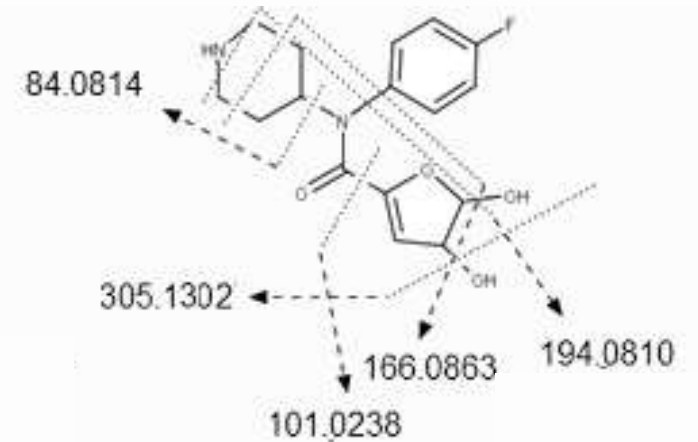
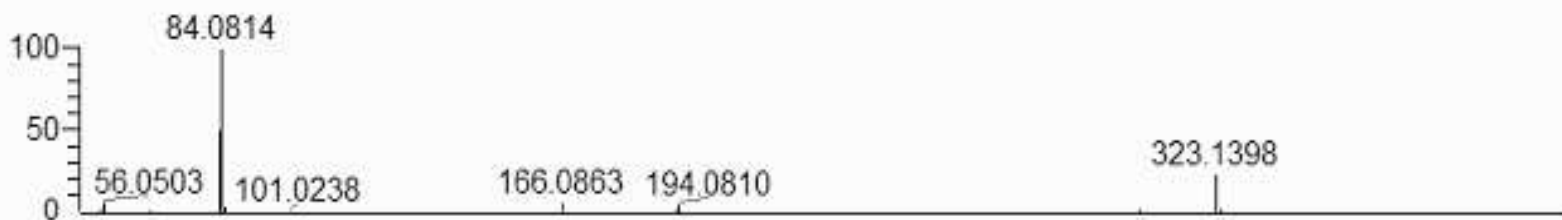
# Identificazione del Ptway metabolico di 4F-FuF

The main metabolite was the dihydrodiol derivative resulting from epoxidation of furan, followed by hydration, which was further N-dealkylated to produce the second most relatively intense metabolites in vivo, whereas N-dealkylation of the parent compound prevailed in vitro.

## Dihydrodiol derivative



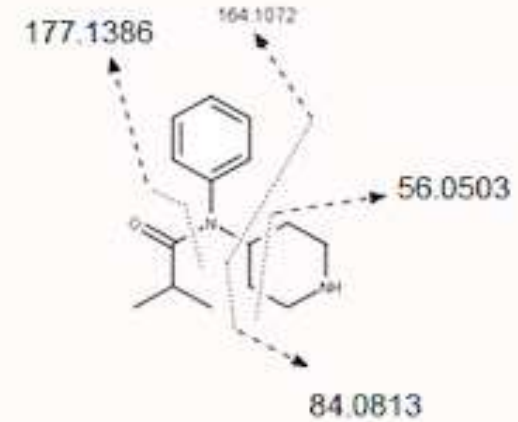
## Dihydrodiol formation + N-Dealkylation



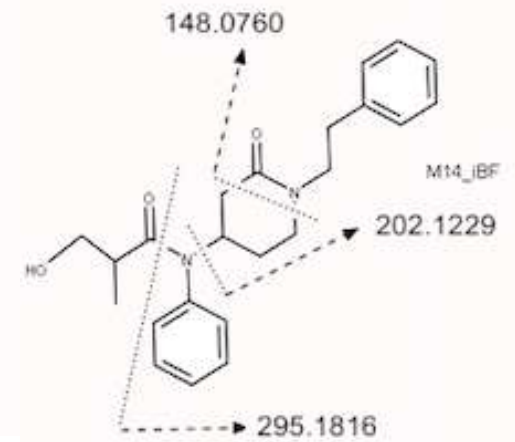
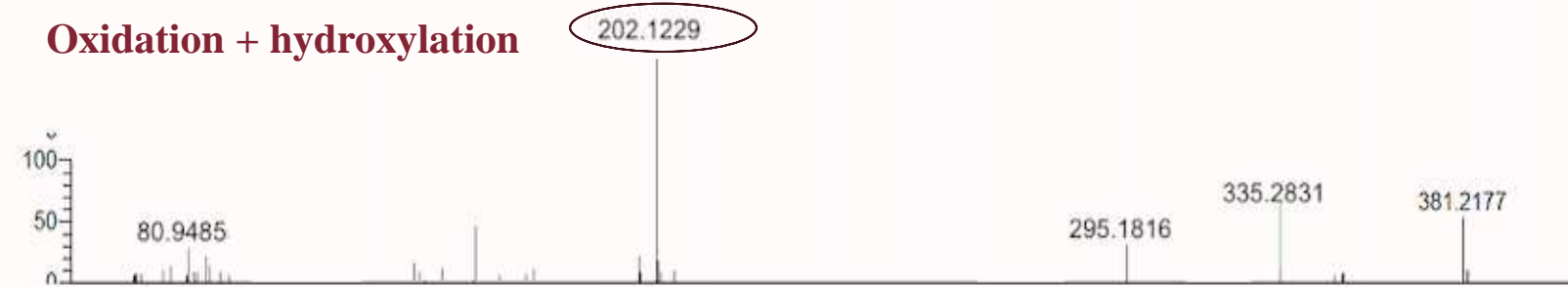
# Identificazione del Ptway metabolico di iBF

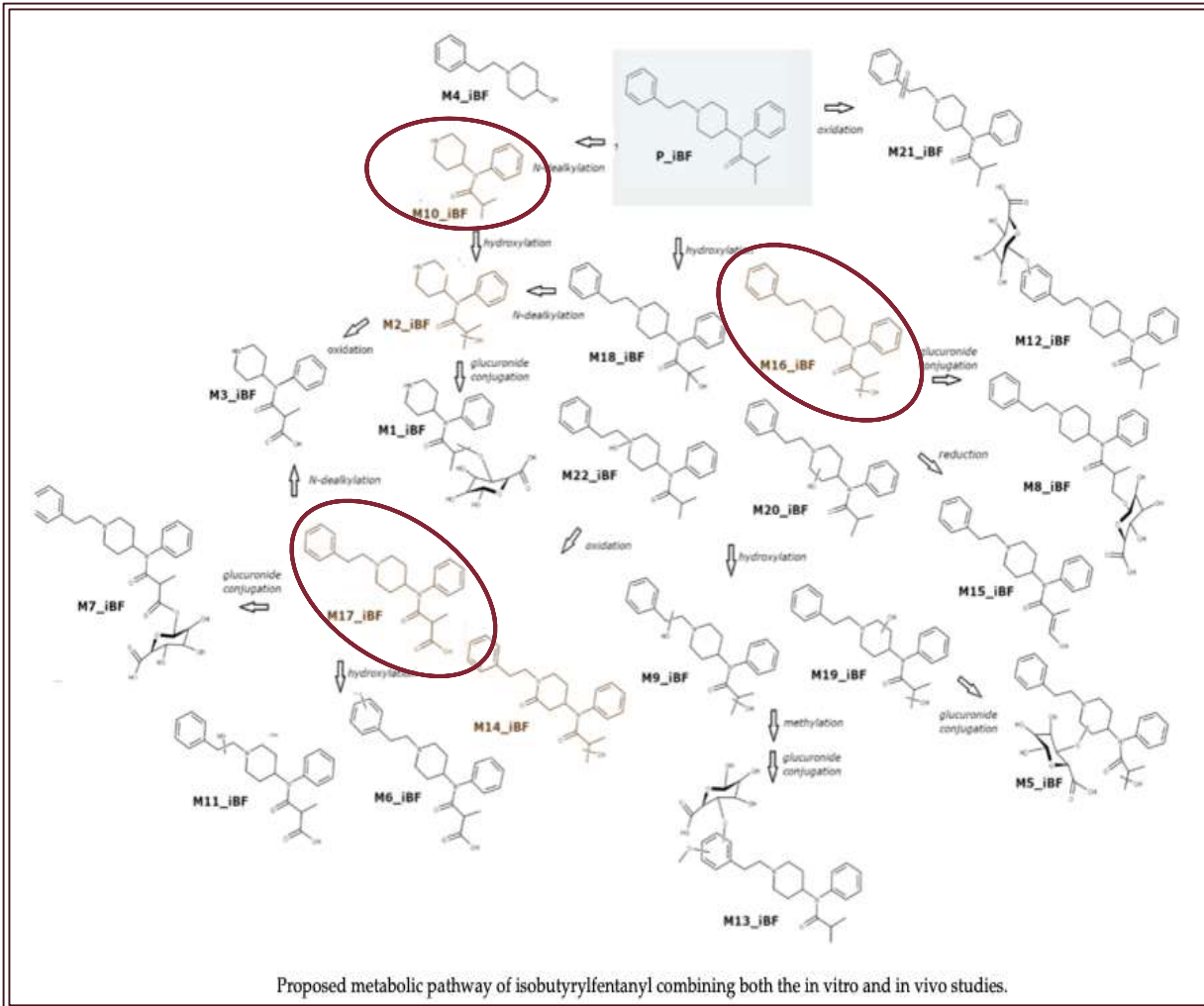
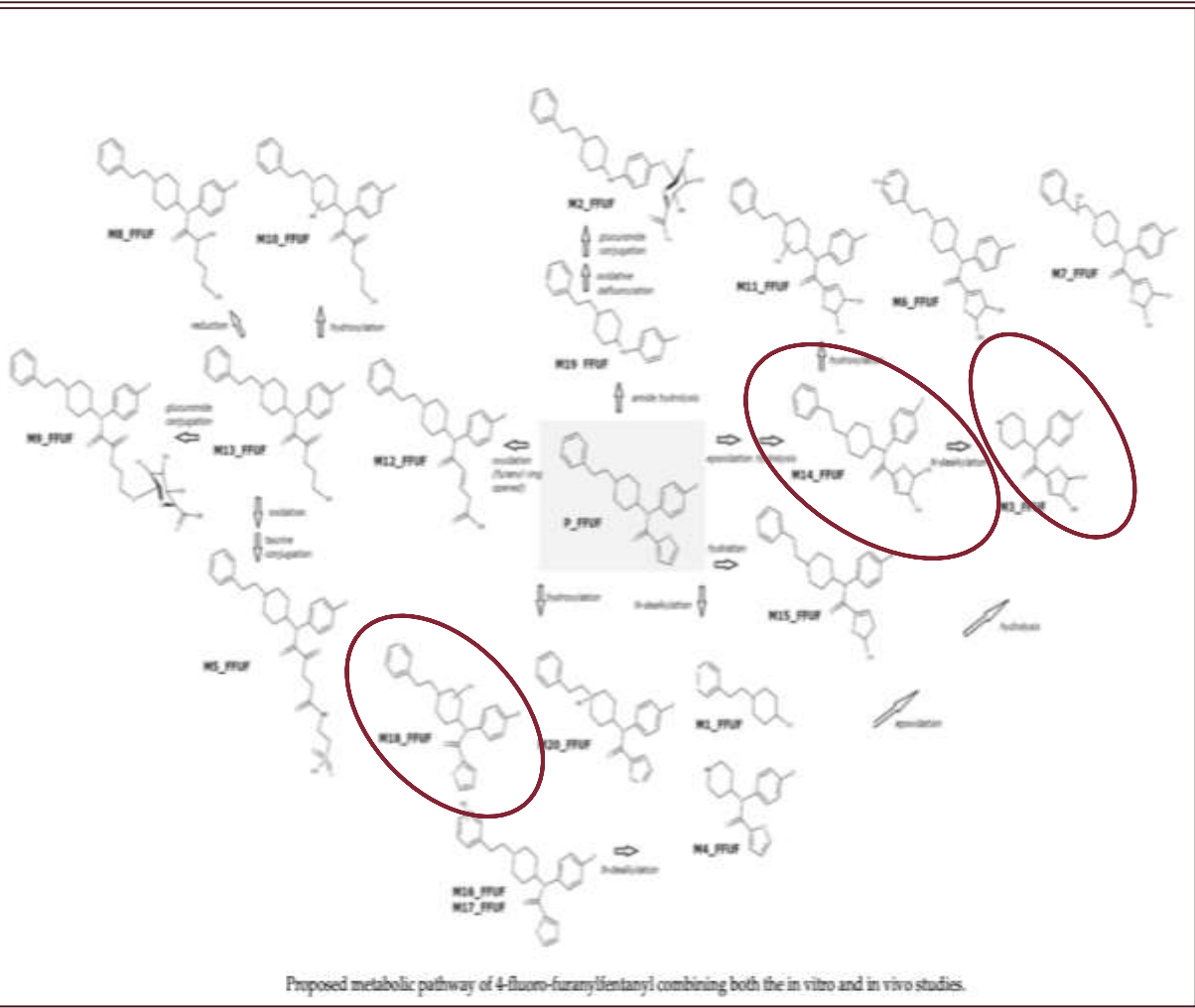
N-dealkylated metabolite was the relatively most intense but hydroxylation and subsequent carbonylation of the parent compound was also a main transformation.

## Oxidative N-dealkylation



## Oxidation + hydroxylation



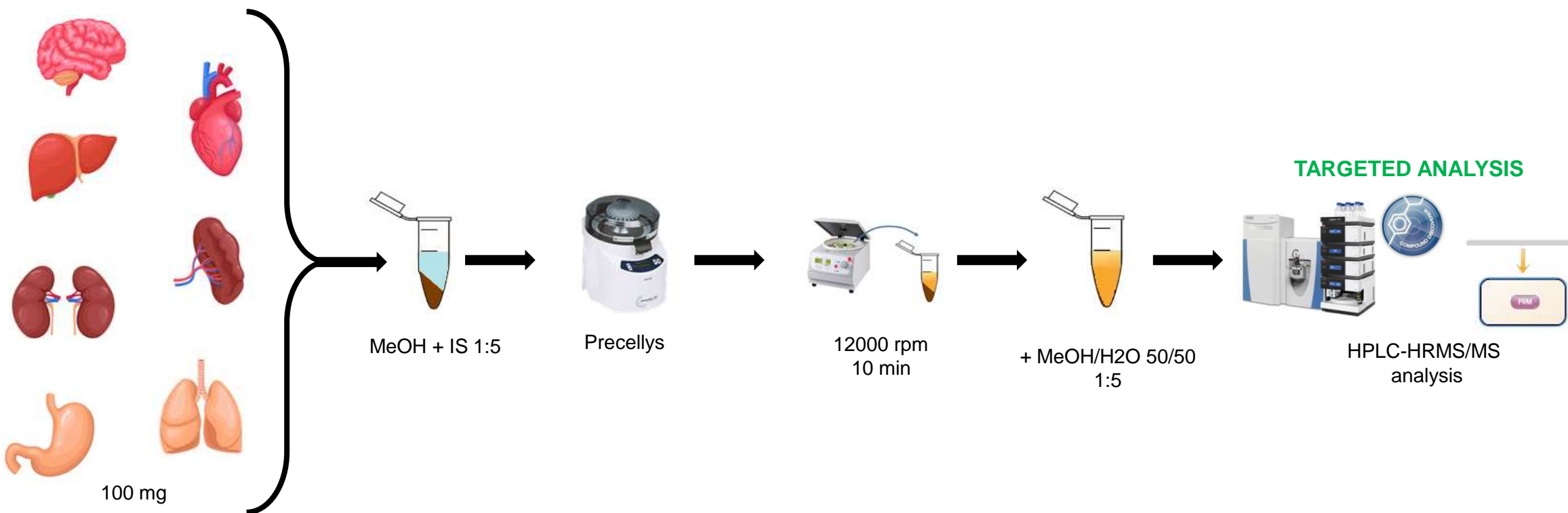


L'incubazione della sostanza con epatociti è un buon approccio per identificare i metaboliti di una sostanza e cercare quindi i biomarkers di assunzione da inserire nei futuri metodi targeted.



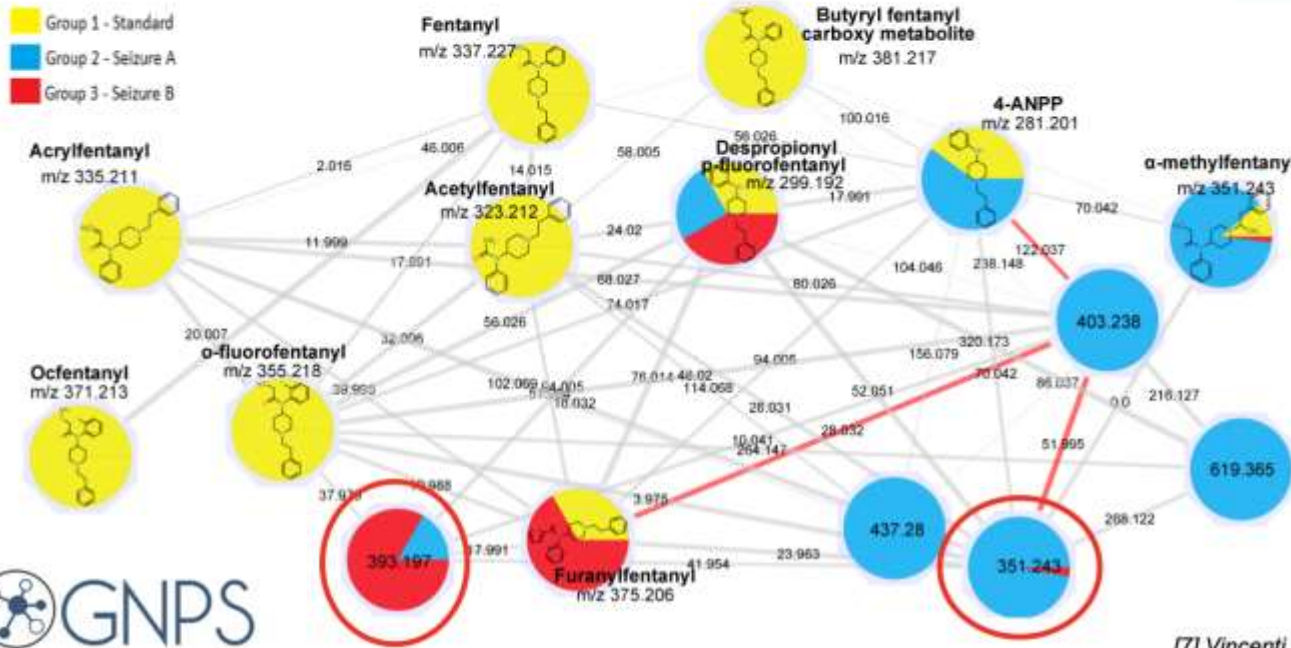
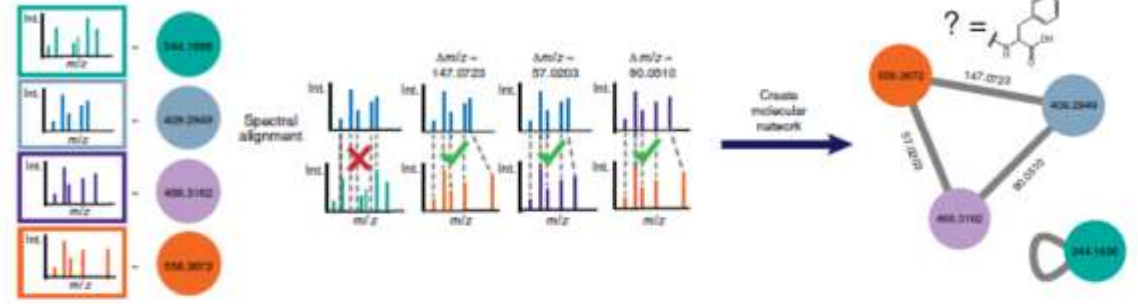


L'importanza degli studio farmaco tossicologici è duplice. Da un lato analizzando I tessuti siamo in grado non solo di capire se sono stati selezionati giusti biomarkers, dall'altra siamo in grado di stabilire gli eventuli organi bersaglio per la sostanza parent e e per I metabolite. In ultimo consente di studiare un piano di intervento rapido per I PS.



# Molecular networking

I molecular networks sono un modo di visualizzare lo spazio chimico presente in esperimenti MS/MS. Gli spettri di molecole appartenenti ad una determinata classe chimica vengono raggruppati in network molecolari perché presentano analogie.

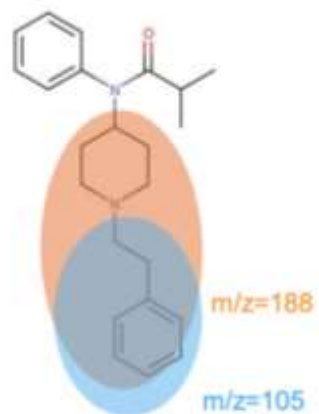


- ✓ Raccolta di spettri MS/MS di standard analitici appartenenti a classi note e creazione di «network standard» (nodi in giallo)
- ✓ Analisi di campioni incogniti sfruttando la molecular networking analysis; gli spettri che presentano analogie con quelli standard vengono messi in evidenza (nodi blu e rossi)

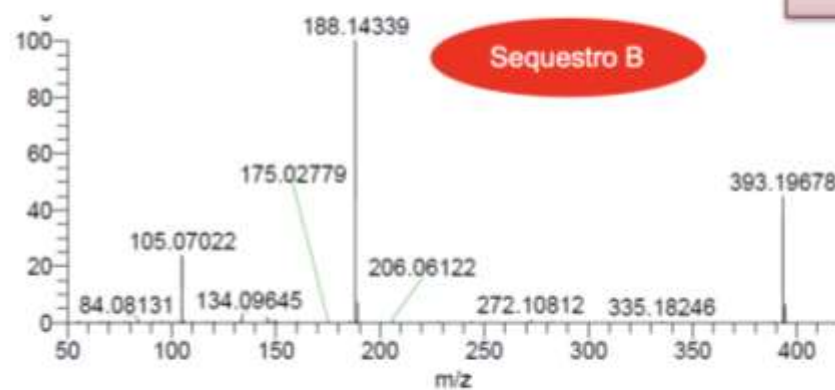
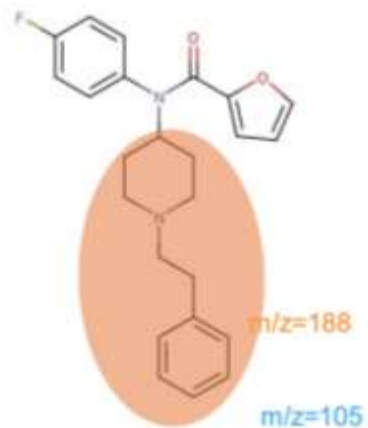
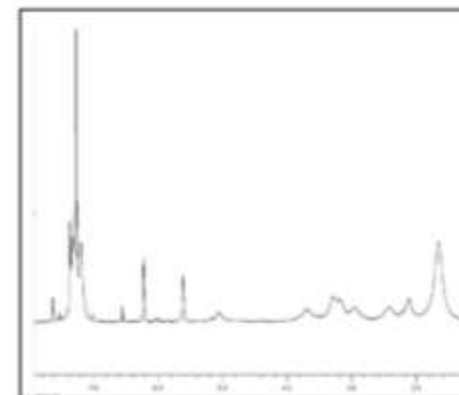
Identificazione di due nuovi analoghi del fentanyl in due sequestri



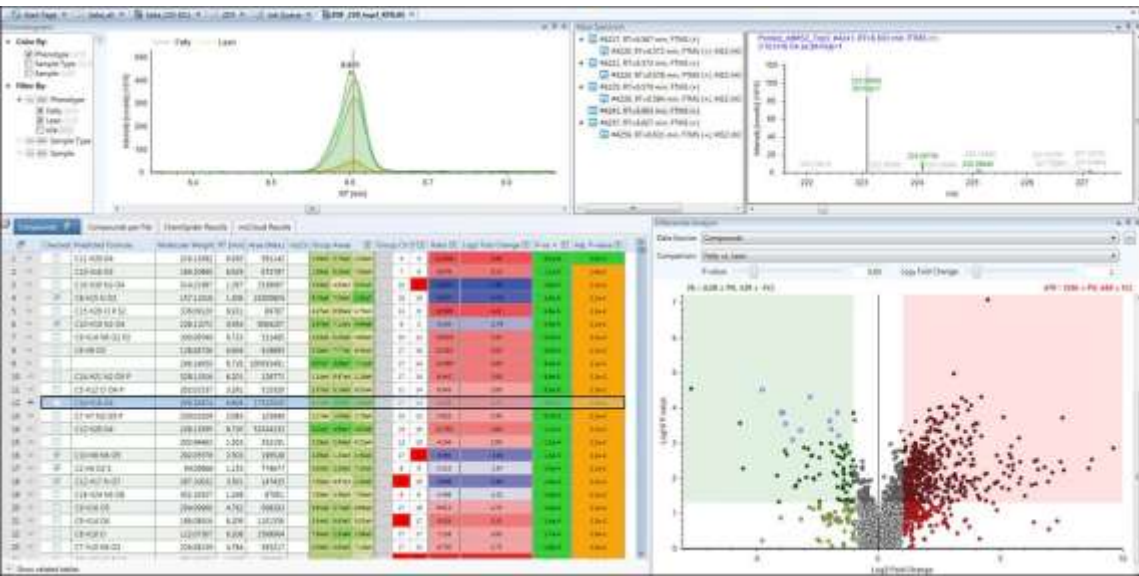
[7] Vincenti, F., Montesano, C., Di Ottavio, F., Gregori, A., *Front. Chem.* (2020) doi: 10.3389/fchem.2020.572952



CONFERMA  
ATTRAVERSO ANALISI  
NMR



[7] Vincenti, F., Montesano, C., Di Ottavio, F., Gregori, A., *Front. Chem.* (2020) doi: 10.3389/fchem.2020.5729



- **Metabolomica:** studio del profilo metabolico di un organismo e delle sue possibili alterazioni a carico di fattori quali dieta, sesso, età, stress, condizioni fisiopatologiche.

→ **CHIMICA CLINICA:** studio del profilo metabolico di **sogetti malati** rispetto ad un gruppo di controlli sani per la **diagnosi precoce di malattie**.

## Applicazioni

→ **CHIMICA ANALITICA FORENSE:** sviluppo di **nuovi metodi analitici** per l'identificazione di **biomarkers** endogeni dell'assunzione di NPS in matrici biologiche.

↓  
**Nuovi oppioidi sintetici o NSOs**





*manuel.sergi@uniroma1.it*