

CdS Biotecnologie Avanzate

Metodologie analitiche per le biotecnologie

ANALISI DI SOSTANZE STUPEFACENTI

Prof. Manuel Sergi

msergi@unite.it

SOSTANZE PSICOATTIVE

Definizione OMS: «Sostanze naturali o sintetiche che agiscono sul sistema nervoso centrale, causando stati di dipendenza fisica e/o psicologica, inducendo tolleranza ed in alcuni casi dipendenza da più sostanze»



Sostanze 'Classiche'



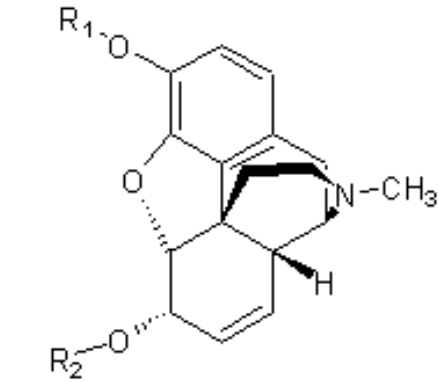
Nuove Sostanze Psicoattive (NPS)

Composti sintetici con effetto psicoattivo non inclusi nella lista di sostanze controllate, create per aggirare i controlli e/o modificare-potenziare l'effetto di sostanze note



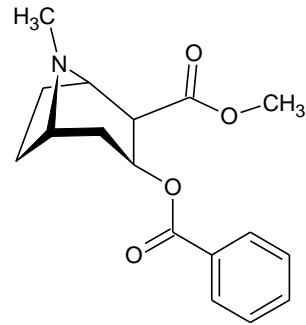
Venduti come incenso, sali da bagno o standard "non per uso umano"

Strutture delle principali sostanze stupefacenti

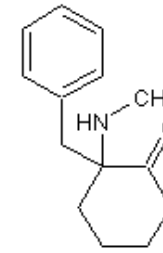


R ₁	R ₂	
-H	-H	Morfina
-CH ₃	-H	Codeina
-H	-COCH ₃	6-MAM
-COCH ₃	-COCH ₃	Ercina

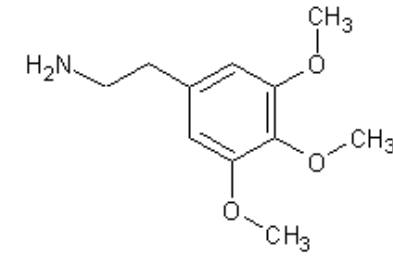
OPPIACEI



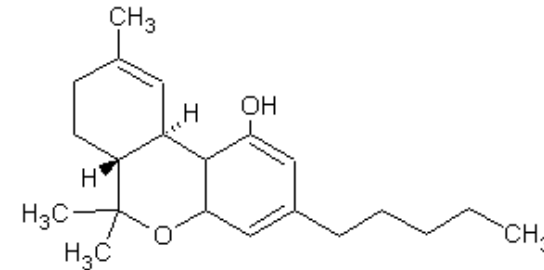
COCAINA



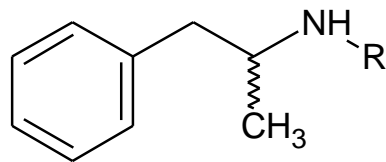
Ketamina



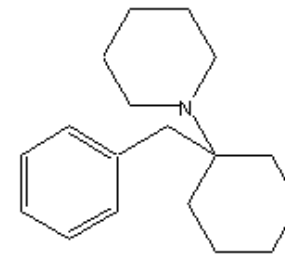
Mescalina



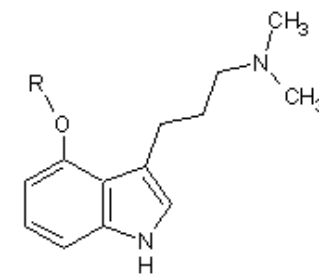
Δ⁹-tetrahydrocannabinol (THC)



AMFETAMINA-SIMILI



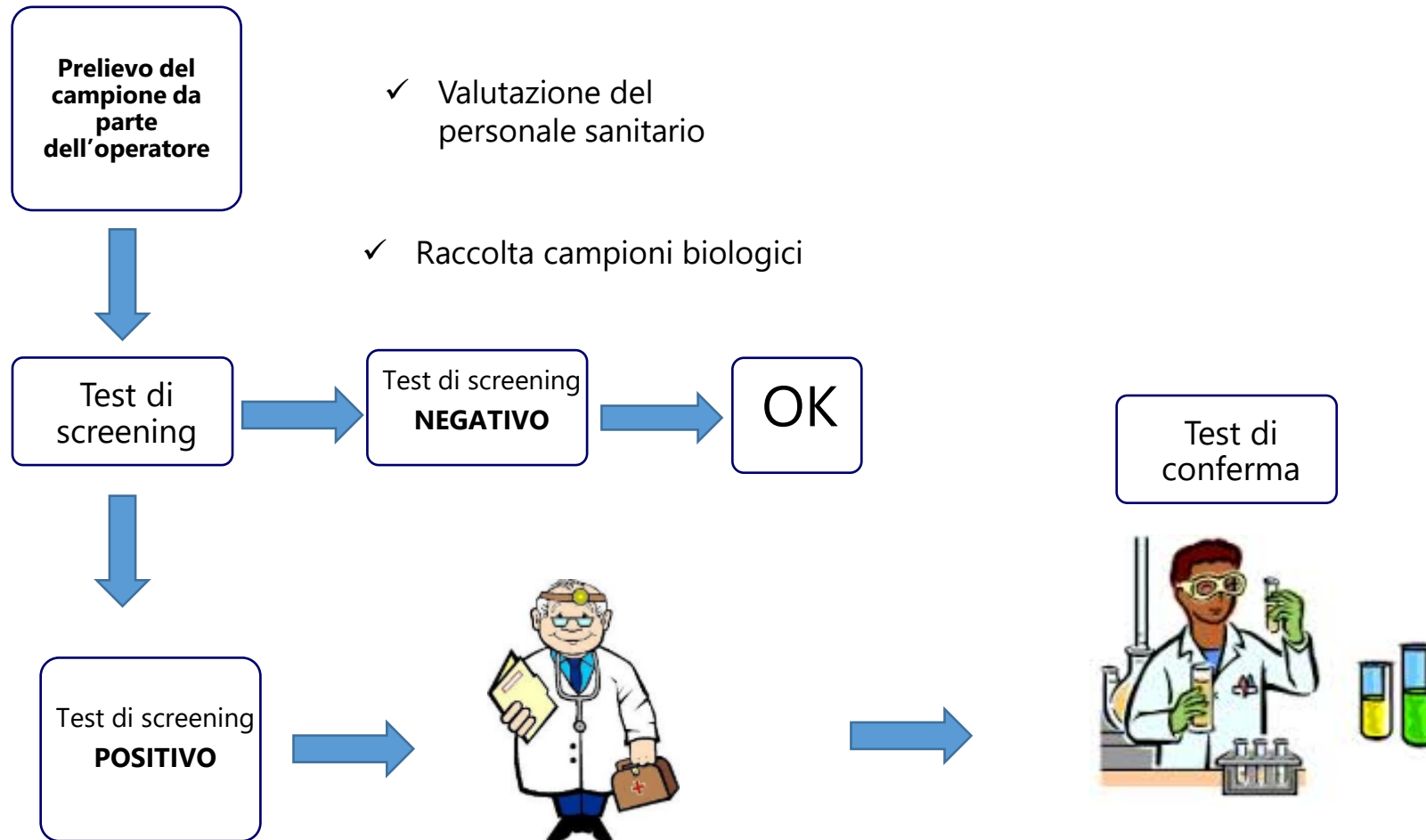
Fenciclidina



R	
-H	Psilocina
-OPO ₃ H ₂	Psilocibina

ALLUCINOGENI

Procedure di controllo



APPROCCIO ANALITICO

Analisi di
screening

- Può essere effettuata direttamente dall'operatore es. su strada

Analisi di
conferma

- Deve essere effettuata da laboratorio certificato

Analisi chimica delle droghe d'abuso in matrice biologica: SCREENING

Screening preliminare utilizzando metodi molto praticabili (anche da personale senza conoscenze specifiche) per differenziare i campioni positivi nel minor tempo possibile

Tali metodi devono essere volti a limitare l'errore di falsi negativi al di sotto di una soglia prestabilita

Esistono in commercio numerosi kit immunochimici atti allo scopo

Analisi chimica delle droghe d'abuso in matrice biologica: CONFERMA

Analisi di conferma qualitativa e quantitativa con una separazione cromatografica seguita da una rilevazione mass-spettrometrica

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

Ottenimento di un maggior numero di punti di identificazione, una misura della specificità del metodo nei confronti di una data sostanza.

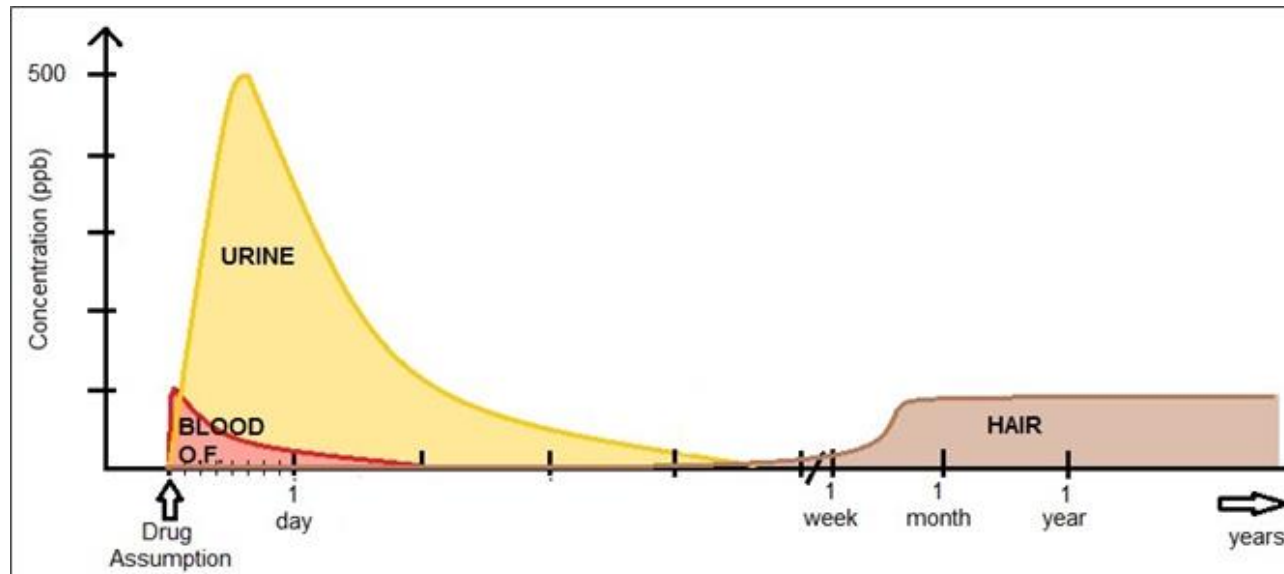
MATRICI BIOLOGICHE

CONVENZIONALI

- Plasma/SIERO
- Urine

NON-CONVENZIONALI

- Capelli
- Fluidi Orali (OF)



MATRICI BIOLOGICHE

- **Sangue**

- **Fluidi Orali**

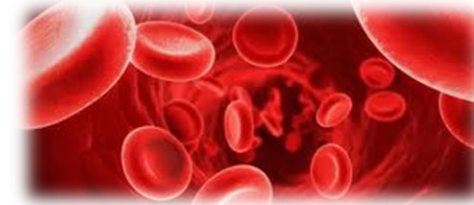
- determinazione di un consumo recente di sostanze stupefacenti
- determinare della presenza di una sostanza d'abuso e/o suoi metaboliti associabile ad un consumo nelle ore immediatamente precedenti

- **Urina**

- consumo relativamente recente
- finestra di rilevabilità temporale di più giorni

- **Matrice Cheratinica**

- "assuntore cronico" o abuso pregresso
- finestre di rilevabilità temporale che dipendono dalla lunghezza



PROCEDURA BIOANALITICA



LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE VIENE ADATTATA PER OGNI MATRICE —

- **Sergi, M.,** Napoletano, S., Analysis of Illicit Drugs in Human Biological Samples by LC-MSⁿ, (2012) LC-MS in Drug Bioanalysis, 349-398, Springer
- Montesano, C., Sergi, M. Microextraction techniques in illicit drug testing: Present and future (2016) Bioanalysis, 8 (9), pp. 863-866.

Matrici biologiche convenzionali

Conoscere la concentrazione plasmatica delle sostanze stupefacenti è necessario per poter dare una valida interpretazione tossicologica al dato analitico

L'invasività del prelievo e la ridotta quantità di volume sono gli svantaggi principali

Per l'urina si perde la correlazione concentrazione-effetto

Il volume a disposizione è maggiore, così come la finestra temporale di determinazione e maggiore è anche la concentrazione di analiti (fino a 100 volte quella di plasma), tuttavia può essere facilmente adulterata

Matrici biologiche non convenzionali

Capelli, saliva o sudore hanno dalla loro la possibilità di un prelievo non invasivo

Nel caso del capello, un allargamento della finestra di rilevazione da ore, giorni a mesi

L'analisi va incontro a difficoltà quali ad esempio la robustezza della matrice cheratinica

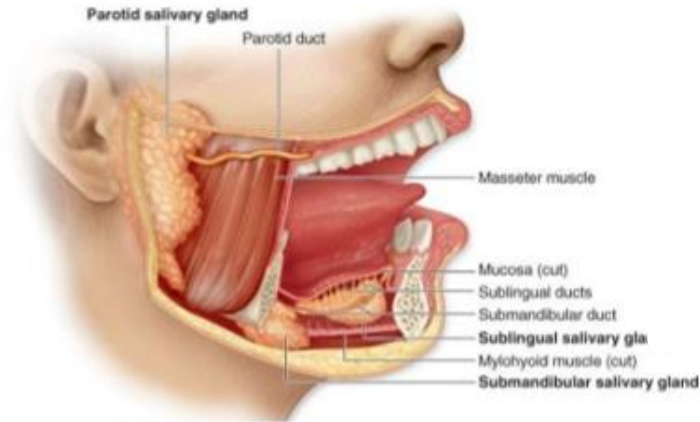
Per la saliva la variabilità di pH salivare, il volume davvero ristretto di campione possono rappresentare un problema

FLUIDI ORALI



- 99.4% acqua
- 0,3% contenuto proteico
- pH varia nell'intervallo 6.2-7.4

- Parotide
- Sottomascellare
- Sublinguale



Vantaggi:

- **Semplicità di raccolta del campione:** senza la necessità di luogo di raccolta, riduzione probabilità di adulterazione
- **Non invasività**
- **Breve finestra di rilevabilità:** compresa tra meno di un'ora e 24 ore dall'assunzione
- **Utilizzo di uno o più tamponi per il campionamento:** senza sub campionamento ed evitare contaminazioni
- **Semplicità di conservazione**



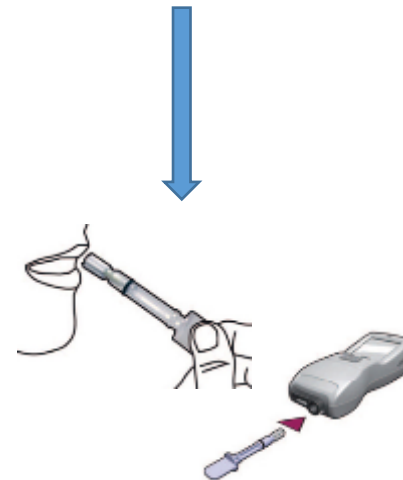
CUT-OFF

Valori di riferimento della European Workplace Drug Testing Society (EWDTS) per i Fluidi Orali (OF)

Classe di sostanze o sostanza	Cut - off di screening (ng/mL)	Cut-off di conferma (ng/ml)
Oppiacei		
<i>Morfina</i>	Oppiacei (Morfina) 40 Oppiacei (6-MAM) 4	15
<i>Codeina</i>		15
<i>Norcodeina</i>		2
<i>6-Acetilcodeina</i>		2
<i>Diidrocodeina</i>		15
<i>6-Monoacetilmorfina</i>		2
Cocaina e metabolita		
<i>Cocaina</i>	Cocaina + metaboliti 30	8
<i>Benzoilecgonina</i>		8
Amfetamina e congeneri		
<i>amfetamina</i>	Amfetamine classe 40	15
<i>metamfetamina</i>		15
<i>MDMA</i>		15
<i>MDA</i>		15
Cannabinoidi		
<i>THC</i>	THC 10	2
Metadone e metaboliti	L-Metadone 50	20
Buprenorfina e metaboliti	5	1

Livello di concentrazione fissato per determinare se il campione è positivo o negativo per la presenza di uno o più sostanze d'abuso

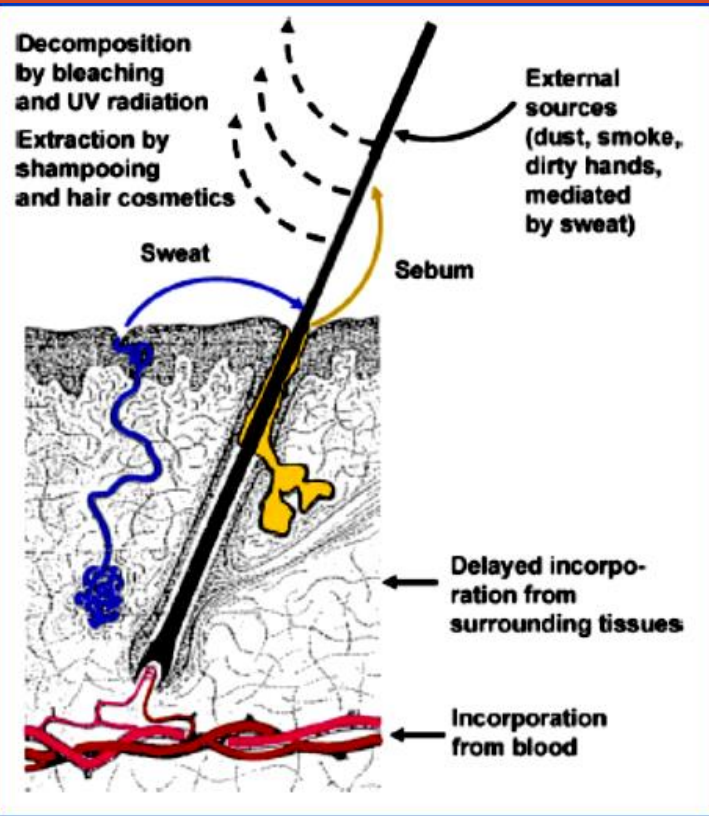
Test di Screening



Test di Conferma



MATRICE PILIFERA



**E' necessario
rimuovere qualsiasi
potenziale
contaminazione
esterna**



Tampone
fosfato

2-Propanolo

Acetone

**Processo
Analitico**

VALORI DI CUT-OFF



According to Society Of Hair Testing (SOHT)

screening		confirmation	
Group	Cut-off (ng/mg)	Target analyte	Cut-off (ng/mg)
Amphetamines	0,2	Amphetamine	0,2
		Metamphetamine	0,2
		MDMA	0,2
		MDEA	0,2
		MDA	0,2
Buprenorphine	0,01	Buprenorphine	0,01
		Norbuprenorphine	0,01
Cannabinoids	0,1	THC	0,05
		THC-COOH	0,0002
Cocaine	0,5	Cocaine	0,5
		BZE, EME, CE, NC	0,05
Ketamine	0,5	Ketamine	0,5
		Norketamine	0,1
Opiates /Opioids	0,2	Morphine	0,2
		Codeine	0,2
		6-Acetylmorphine	0,2

Analisi chimica delle droghe d'abuso in matrice biologica

Screening preliminare utilizzando metodi molto praticabili (anche da personale senza conoscenze specifiche) per differenziare i campioni positivi nel minor tempo possibile

Tali metodi devono essere volti a limitare l'errore di falsi negativi al di sotto di una soglia prestabilita

Esistono in commercio numerosi kit immunochimici atti allo scopo

Analisi di conferma qualitativa e quantitativa con una separazione cromatografica seguita da una rilevazione mass-spettrometrica

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

Ottenimento di un maggior numero di punti di identificazione, una misura della specificità del metodo nei confronti di una data sostanza.

Analisi chimica delle droghe d'abuso in matrice biologica

Tecnica/che	Numero di ioni	Punti di identificazione
GC-MS (EI o CI)	N	n
GC-MS (EI e CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI o CI) 2 derivati	2 (Derivato A) + 2 (Derivato B)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 precursore e 2 figlie	4
LC-MS-MS	1 precursore e 2 figlie	4
GC-MS-MS	2 ioni precursori, ciascuno con 1 figlia	5
LC-MS-MS	2 ioni precursori, ciascuno con 1 figlia	5
LC-MS-MS-MS	1 precursore, 1 figlia e 2 nonne	5,5
HRMS	N	2 n
GC-MS e LC-MS	2 + 2	4
GC-MS e HRMS	2 + 1	4

Esempi di punti di identificazione ottenuti da alcune tecniche analitiche

GC-MS per l'analisi di droghe

La gas-cromatografia con rilevazione di massa è da molto tempo il metodo di riferimento

Le metodiche GC-MS necessitano di derivatizzazione per molti analiti (i.e. le anfetamine, BEG e molti barbiturici) altrimenti instabili ad alte temperature o non rilevabili

La derivatizzazione aumenta il costo totale del metodo oltre che il tempo di analisi

Possibilità di introduzione di grandi errori nelle analisi e perdita di riproducibilità

LC-MS per l'analisi di droghe

La LC-MS s'è dimostrata un potente mezzo di indagine nell'ambito forense:

- per l'analisi di tracce, vista la grande sensibilità anche in presenza di quantità minime di campione
- analisi di agenti chimici, esplosivi o coloranti
- droghe d'abuso in campioni biologici o analisi tossicologiche sistematiche

Pretrattamento del campione

Il pretrattamento del campione è uno step critico della metodica analitica, che richiede un'attenta ottimizzazione per minimizzarne il contributo di errore al dato analitico finale.

Per esempio un'estrazione che preveda una fase di evaporazione può causare perdita di campioni basso bollenti (i.e. le anfetamine)

Per separare gli analiti dalla matrice è indispensabile conoscerne composizione e proprietà chimiche.

L'analisi chimica in matrici biologiche

- Matrici biologiche convenzionali per la determinazione di droghe d'abuso
 - plasma e urine
- Saliva: fisiologia e trasferimento di sostanze

Matrici biologiche convenzionali

Conoscere la concentrazione plasmatica delle sostanze stupefacenti è necessario per poter dare una valida interpretazione tossicologica al dato analitico

L'invasività del prelievo e la ridotta quantità di volume sono gli svantaggi principali

Per l'urina si perde la correlazione concentrazione-effetto

Il volume a disposizione è maggiore, così come la finestra temporale di determinazione e maggiore è anche la concentrazione di analiti (fino a 100 volte quella di plasma), tuttavia può essere facilmente adulterata

Matrici biologiche non convenzionali

Capelli, saliva o sudore hanno dalla loro la possibilità di un prelievo non invasivo

Nel caso del capello, un allargamento della finestra di rilevazione da ore, giorni a mesi

L'analisi va incontro a difficoltà quali ad esempio la robustezza della matrice cheratinica

Per la saliva la variabilità di pH salivare, il volume davvero ristretto di campione possono rappresentare un problema

L'analisi in plasma

Il plasma è la parte liquida del sangue, composta dal 93% di acqua ed il 7% tra proteine in sospensione, elettroliti inorganici, e molecole organiche: nutrienti ([glucosio](#) o [lipidi](#)), ormoni, prodotti del metabolismo, [anidride carbonica](#) ed [ossigeno](#)

Il pH fisiologico è in media 7,4 sotto stretto controllo mediante sistema tampone del sangue (bicarbonato-acido carbonico – emoglobinato-emoglobina – fosfato basico-fosfato acido), diffusione ed eliminazione dell'anidride carbonica con la ventilazione polmonare, escrezione renale di ioni idrogeno.

Le proteine plasmatiche, albumine (ne rappresentano il 60% circa), globuline e fibrinogeno, rappresentano un problema nell'analisi chimica in quanto ad esse si legano molte molecole, droghe d'abuso incluse.

E' necessario rompere i legami con le proteine plasmatiche prima della determinazione analitica

L'analisi in saliva

La saliva è composta per il 99% circa da acqua, in cui sono disciolti costituenti inorganici (ioni sodio, potassio, calcio, magnesio, bicarbonato, fosfato, fluoro e tiocianato), sostanze organiche, cellule di sfaldamento dell'epitelio orale e alcuni microrganismi.

La composizione della saliva può variare continuamente a seconda della secrezione. Il flusso va da 0.05 (nel sonno) fino a 6 ml/min ed è soggetto a molti stimoli: stimoli meccanici (chewing-gum), stimolazione acida e qualsiasi stimolazione intensa del sistema nervoso centrale (emozioni, paura, stress)

Il pH nella saliva a riposo è inferiore a quello plasmatico e leggermente acido, varia tra 5,8 e 6,4, mentre a seguito di stimolazione aumenta fino ad un massimo di 7,8-8,0

Il passaggio di sostanze dal plasma alla saliva risente molto della variabilità del pH

Validazione

Linee guida SOFT-AAFS (*Society Of Forensic Toxicology – American Academy of Forensic Science*)

I parametri sono: precisione, accuratezza, recupero, LOD e LOQ, calibrazione, specificità

«The use of mass spectrometry is recommended as the confirmatory technique. For example, detection of an analyte by immunoassay and 'confirmation' by GC/NP or GC/FID does not generally provide sufficient specificity for prosecution of a criminal case.

It is a good practice to confirm the identity of an analyte in a different extract of the same specimen from that used for the first test, or in a second specimen. However, confirmation of a drug or toxin in the same original extract of a single specimen would not normally be regarded as acceptable, since that would not rule out the possibility that the extract became contaminated during the extraction or that the wrong sample was tested.»

Linee guida SOFT-AAFS

«When conducting analyses, laboratories may group specimens into batches. Each batch should contain a sufficient number of calibrators and controls, the total number of which will depend on the size of the batch and the nature of the tests.

Appropriate matrix-matched calibrators should, when possible, be prepared and tested concurrently with the specimens.

The use of a suitable internal standard for all chromatographic assays is recommended. The internal standard should have chemical and physical properties as similar to the analyte as possible.

Stable isotope (e.g. deuterated) standards are recommended for GC/MS and LC/MS assays, although well chosen non-deuterated internal standards may occasionally give equivalent or better performance.»

La certificazione dei Laboratori di Controllo

La **Certificazione della Qualità ISO 9001** è uno standard internazionale applicabile da tutte le organizzazioni, operanti in qualsiasi settore di attività.

E' processo che verifica la conformità di un sistema organizzativo ai criteri riportati nelle norme ISO di riferimento, al fine di aumentare la fiducia nei prodotti e nei servizi forniti.

La ISO 9001 fornisce un modello organizzativo di base ed è basata su otto principi di gestione per la qualità (tutti indispensabili per una buona conduzione aziendale).

- Focalizzazione sul cliente
- Leadership
- Coinvolgimento del personale
- Approccio per processi
- Approccio sistemico alla gestione
- Miglioramento continuo
- Decisioni basate su dati di fatto
- Rapporti di reciproco beneficio con i fornitori

Le fasi principali dell'iter di certificazione comprendono:

- definizione dello scopo di certificazione;
- verifica preliminare (su richiesta): analisi delle lacune e valutazione dell'attuale conformità dell'organizzazione ai requisiti normativi;
- verifica di certificazione in due fasi (initial & main): verifica della conformità del sistema rispetto alla norma di riferimento ed emissione del certificato;
- visite di sorveglianza per valutare il miglioramento continuo;
- rinnovo della certificazione dopo 3 anni a seguito di una verifica completa.

Al termine di ogni visita, all'azienda viene consegnato un rapporto chiaro e completo, che consente di migliorare continuamente le prestazioni in materia di gestione della qualità.

Principali benefici

- Dimostra l'impegno dell'azienda o ente verso la qualità e la soddisfazione dei clienti
- Assicura che i prodotti e i servizi offerti dall'azienda tengano effettivamente conto delle esigenze del cliente e dei requisiti cogenti e normativi
- Permette di misurare il progresso dell'azienda verso il continuo miglioramento del suo rendimento di mercato utilizzando uno standard di riferimento con cui confrontarsi
- Aiuta a migliorare i risultati dell'azienda in termini organizzativi.

Fasi dell'accreditamento

Domanda di accreditamento



Fase preliminare: studio dei processi e stesura procedure



Visita presso il laboratorio dell'ente e verifica requisiti



Consegna certificazione



Verifica periodica e rinnovo

La certificazione del nostro Laboratorio è stata rilasciata dalla Bureau Veritas, riconosciuto da istituzioni di Accreditazione nazionali e internazionali quale Organismo di Certificazione ISO 9001, a seguito di un audit che ha coinvolto le unità organizzative e di ricerca dei laboratori di chimica analitica.

BUREAU VERITAS
Certification



UNIVERSITA' DI TERAMO
LABORATORIO DI SPETTROMETRIA
DI MASSA

Via Balzarini, 1 - 64100 TERAMO (TE)

Sede oggetto di certificazione:

Via Balzarini, 1 - 64100 TERAMO (TE)

Bureau Veritas Italia S.p.A. certifica che il sistema di gestione dell'organizzazione sopra indicata è stato valutato e giudicato conforme ai requisiti della norma di sistema di gestione seguente

ISO 9001:2015

Campo di applicazione

Determinazioni analitiche mediante tecniche quali/quantitative di sostanze da abuso in matrici biologiche.

Settore/i IAF: **34**

Data della certificazione originale: **04 maggio 2018**

Data di scadenza precedente ciclo di certificazione: **NA**

Data dell'Audit di certificazione / rinnovo: **05 aprile 2018**

Data d'inizio del presente ciclo di certificazione: **04 maggio 2018**

Soggetto al continuo e soddisfacente mantenimento del sistema di gestione questo certificato è valido fino al: **03 maggio 2021**

N° Certificato - Revisione: **IT280987-2** del: **15 maggio 2020**

GIORGIO LANZAFAME - Local Technical Manager

Indirizzo dell'organismo di certificazione:
Bureau Veritas Italia SpA Viale Monza, 347 - 20126 Milano, Italia

Ulteriori chiarimenti sul campo di applicazione di questo certificato e sui requisiti applicabili della norma del sistema di gestione possono essere ottenuti consultando l'organizzazione. Per controllare la validità di questo certificato consultare il sito www.bureauveritas.it



SGQ N° 009A
Membro degli Accordi di Riconoscimento SA, IAF e ILAC
Registry of SA, IAF and ILAC mutual Recognition Agreements

Il manuale per la qualità

Il Manuale per la qualità ha lo scopo di descrivere gli elementi principali del sistema di gestione implementato ed applicato dal Laboratorio.

Il documento deve essere redatto nel rispetto dei requisiti della UNI EN ISO 9001:2015 ed ha lo scopo di descrivere “cosa” fa il laboratorio per il miglioramento continuo delle prestazioni dei processi e per l’efficace gestione del rischio (inteso come pericolo o opportunità) legato alle attività svolte.

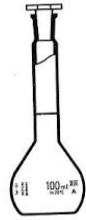
Nel Manuale Qualità sono descritti:

- i processi del Sistema Qualità e la loro interazione
- i riferimenti alle Procedure di Qualità;
- la politica direzionale in materia di Qualità e definire l'approccio generale agli aspetti trattati;
- regole relative alla Gestione della Qualità ;
- regole per la conduzione delle valutazioni operate da terzi.

EXTRACTION METHOD: PLASMA

-EXTRACTION STEP

100 μ L of plasma



240 μ L+50 μ L
ACN/MeOH
+8 μ L of internal standard



Sonication 30'



-20°C for 20 minutes

1° Centrifugation



5000 rpm
15 minuti



2° Centrifugation

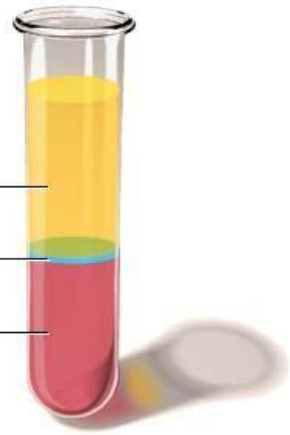


12000 rpm
15 minuti

supernatant
placed in vial +
100 μ L MeOH.




Plasma (55%)
Globuli bianchi
e Piastrine (<1%)
Globuli rossi (45%)



EXTRACTION METHOD: HAIR

-DECONTAMINATION STEP

- 
- 2mL
- 50 mg aliquot of piliferous matrix is cut into small segments and placed in a 5 ml glass vial

1°washing

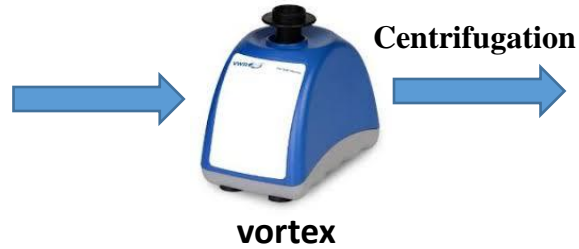
Phosphate
buffer pH6

2°washing

Isopropanol

3°washing


Dichloromethane



The hair is cut near the skin



-EXTRACTION STEP

- 
- +450µL MeOH
+ 4.5µL S.I.



After 18
hours

Filtere with 0,22 µm PTFE



METHOD:

LIQUID CHROMATOGRAPHY

- **Column:** Ace Excel 2 C18 PFP 2.1x100mm thermostated at a temperature of 40 °
- **Phase A:** H₂O 5 mM Formic Acid(HCOOH)
- **Phase B:** MeOH:ACN (50:50) 5 mM HCOOH

Elution gradient for the positive analysis method:

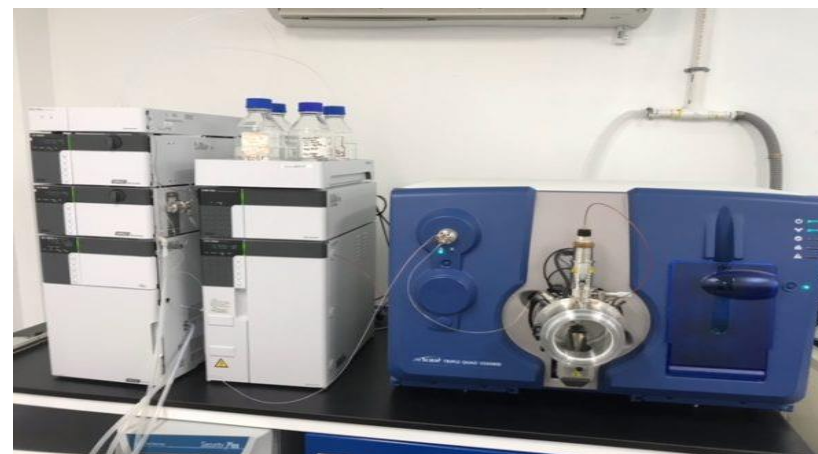
- 0.0 - 0.3 minutes: 20% B
- 0.1 - 7 minutes: 20-99% B
- 7 - 9.5 minutes: 99% B
- 9.5 - 10 minutes 20%B

Elution gradient for the negative analysis method:

- 0.0 - 0.1 minutes : 60% B
- 0.1 - 2 minutes : 60-99% B
- 2 - 3.5 minutes : 99% B
- 3.5 – 3.6 minutes : 60% B

UHPLC Shimadzu Nexera

Sciex Qtrap 4500 mass spectrometer equipped with a V turbo source, which works in ESI positive and negative mode.



METHOD:

LIQUID CHROMATOGRAPHY

In this regard, two separate methods have been optimized for the extraction of the analytes in question from the two biological matrices and two LC-MS / MS methods have been optimized, one with positive ionization and one with negative ionization, for qualitative and quantitative analysis analytes:



POSITIVE IONIZATION

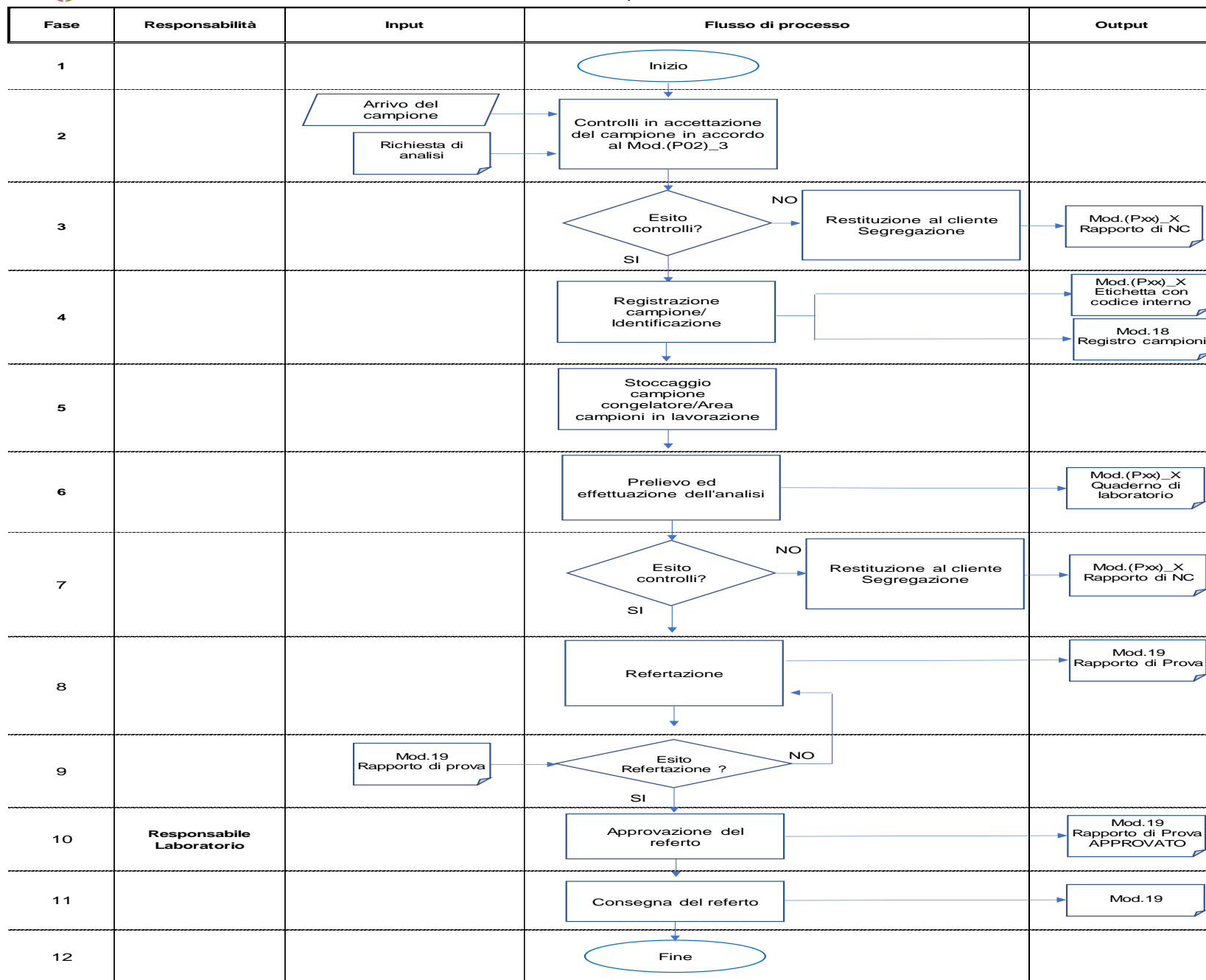
- AMPHETAMINE,
- METHAMPHETAMINE
 - MDA,
 - MDMA,
 - COCAINE
 - BEG
 - NORCOCAINE
 - MORPHINE
 - 6-MAM
- Δ9-TETRAHYDROCANNABINOL
 - METHADONE
 - EDDP



NEGATIVE IONIZATION

-THC COOH

Both methods involve the use of deuterated internal standards which are added to the sample upstream of the extraction method with the aim of monitoring its efficiency therefore a solution containing the 6 internal standards is prepared (amphetamine d6, morphine d3, cocaine d3, THC d3, THC COOH d3 and MDMA d5) at the concentration of 1 ppm



Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)

LINEE GUIDA PER LE STRUTTURE DOTATE DI LABORATORI PER GLI
ACCERTAMENTI DI SOSTANZE D'ABUSO CON FINALITA' TOSSICOLOGICO-
FORENSI E MEDICO-LEGALI SU CAMPIONI BIOLOGICI PRELEVATI DA VIVENTE.

Revisione n. 5 del 29 maggio 2017 a cura della Commissione Qualità¹ dell'Associazione Scientifica "Gruppo Tossicologi Forensi Italiani" (GTFI)

Le Linee Guida, ideate quale elemento di autodisciplina e requisito fondamentale di un sistema di gestione per la qualità, si propongono come componente essenziale di un auspicabile processo di "accreditamento all'eccellenza" per Strutture dotate di laboratori di analisi di sostanze d'abuso a scopo forense.

E' necessario, quindi, che dette strutture adottino un sistema di gestione per la qualità che esprima e verifichi la politica della qualità, basato sui seguenti principi:

- efficacia organizzativa;
- - eccellenza del risultato;
- - costante miglioramento dello standard di qualità;
- - responsabilizzazione del personale nell'assicurare la qualità del lavoro svolto e diffusione della politica della qualità a tutto il personale della Struttura;
- - costante riesame della politica della qualità e dei relativi obiettivi.

Ring test o prove interlaboratorio

- Le **prove valutative interlaboratorio** permettono al singolo laboratorio accreditato di mettere a raffronto il proprio operato con quello degli altri, ottenendo un riscontro sull'affidabilità delle proprie prestazioni o sulla necessità di indagare su potenziali problemi.
- La valutazione delle prestazioni dei laboratori di prova, fornisce una verifica periodica, obiettiva, indipendente e documentata della qualità delle analisi eseguite di routine.
- La partecipazione alle prove valutative interlaboratorio è uno strumento di autocontrollo adeguato e indipendente, che aiuta a migliorare la qualità delle prestazioni offerte.
- Vengono gestiti da organismi accreditati e consistono nell'esecuzione, da parte di laboratori accreditati diversi, di prove riconosciute da protocolli operativi adeguati (*Proficiency Testing – PT*), su materiali identici o simili, e nella loro valutazione secondo criteri oggettivi prestabiliti.

Ring test o prove interlaboratorio

I vantaggi

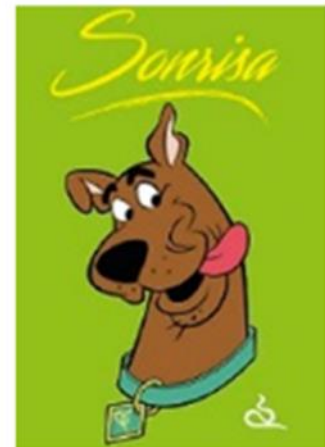
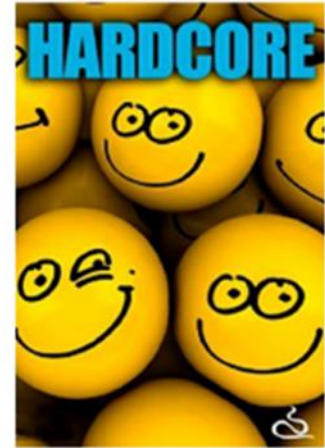
- ✓ Performance di successo ottenute in una serie regolare di prove valutative interlaboratorio infondono fiducia nell'attendibilità delle prestazioni fornite.
- ✓ La scelta del laboratorio di sottoporre regolarmente a controlli e valutazioni le proprie prestazioni di misurazione attraverso l'apposito sistema di PT accreditato, costituisce una garanzia di qualità.
- ✓ La possibilità di esaminare la propria prestazione analitica consente di dimostrare in maniera oggettiva l'affidabilità delle proprie prestazioni a clienti, fornitori, Enti di controllo, Enti di accreditamento, Autorità di regolamentazione.

La VEQ deve essere in grado di:

1. valutare le prestazioni analitiche del singolo laboratorio e favorirne il miglioramento
2. identificare il “bias” (inesattezza) del singolo laboratorio clinico nel confronto con altri laboratori per promuovere l’uniformità dei risultati ottenuti in laboratori differenti,
3. permettere ai laboratori partecipanti di valutare il “bias” e le eventuali interferenze dei metodi utilizzati, fornendo quindi un’informazione affidabile sulla qualità dei metodi e sull’eventuale necessità di sostituire il metodo in uso,
4. permettere una valutazione delle prestazioni in rapporto a specifiche di qualità di riconosciuto valore.

LE NUOVE SOSTANZE PSICOATTIVE (NPS)

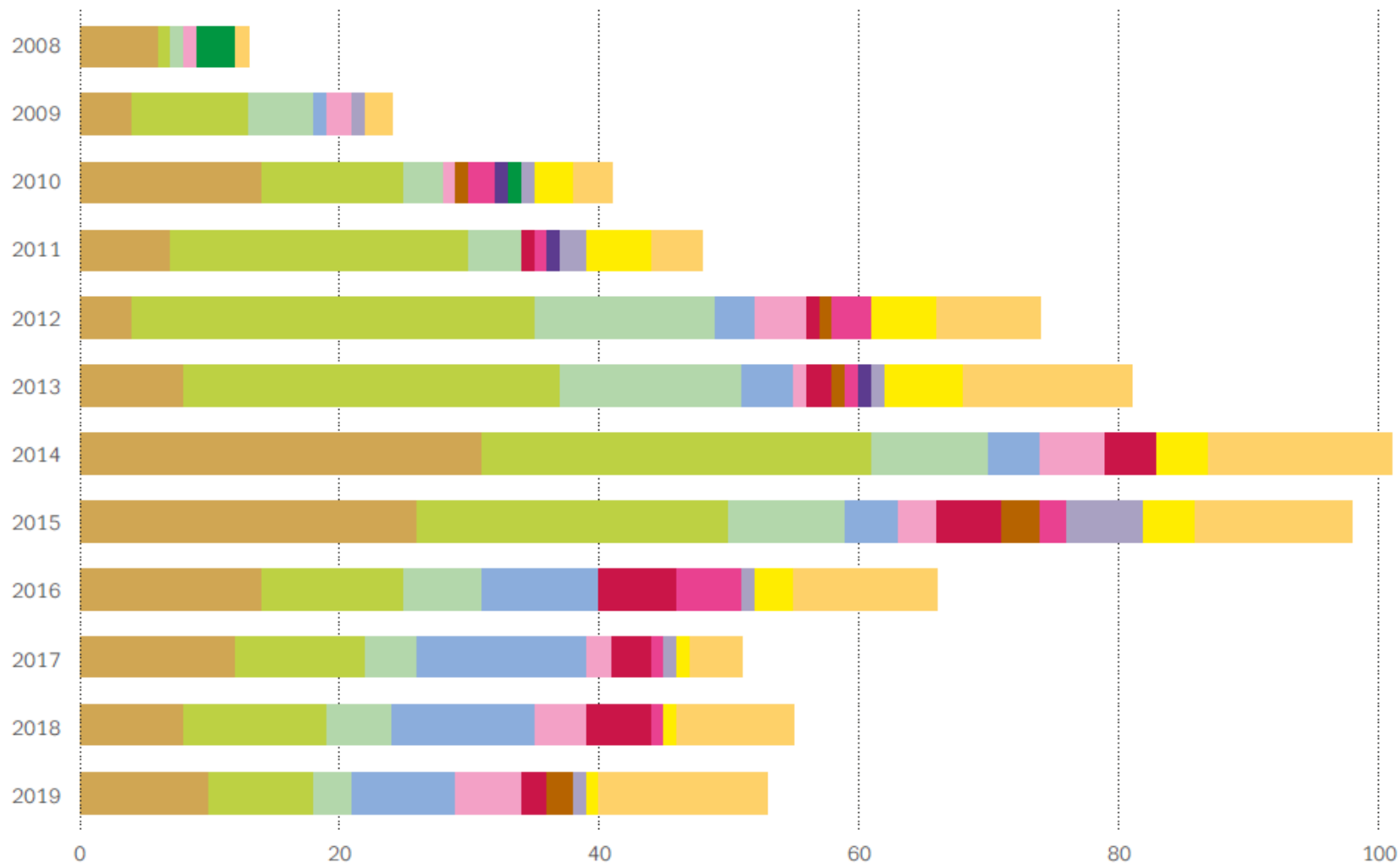
- Il sistema di allerta precoce dell'UE continua a scoprire ogni anno oltre 50 nuove sostanze psicoattive.
- Inoltre, sul mercato europeo si reperiscono 400 nuove sostanze psicoattive già segnalate in precedenza.
- Alla fine del 2019 l'EMCDDA monitorava circa 790 nuove sostanze psicoattive, 53 delle quali sono state segnalate in Europa per la prima volta nel 2019.
- Tra esse figurano stimolanti, cannabinoidi sintetici, benzodiazepine, oppiacei, allucinogeni e sostanze con proprietà dissociative.



DEFINIZIONE DI NPS

- Le NPS sono conosciute nel mercato come "legal highs", "sali da bagno", o anche come "prodotto chimico per ricerca".
- 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 della Single Convention on Narcotic Drugs (1961) o nella Convention on Psychotropic Substances (1971), ma che rappresentano un rischio effettivo per la salute pubblica".
- Il termine "nuovo" non si riferisce necessariamente ad una sostanza del tutto nuova, infatti numerose sostanze sono state sintetizzate anche anni prima, ma che appaiono nel mercato di recente.
- La rapida comparsa di un grande numero di NPS nel mercato globale rappresenta un rischio per la salute ed una sfida per il contrasto agli stupefacenti.
- Spesso si hanno poche informazioni sulle caratteristiche tossicologiche di queste sostanze con conseguenti problemi nella gestione sanitaria, quindi è importante avere metodiche analitiche adeguate per l'identificazione di queste sostanze che appartengono a diverse classi chimiche.
- Un altro aspetto importante è la condivisione delle informazioni

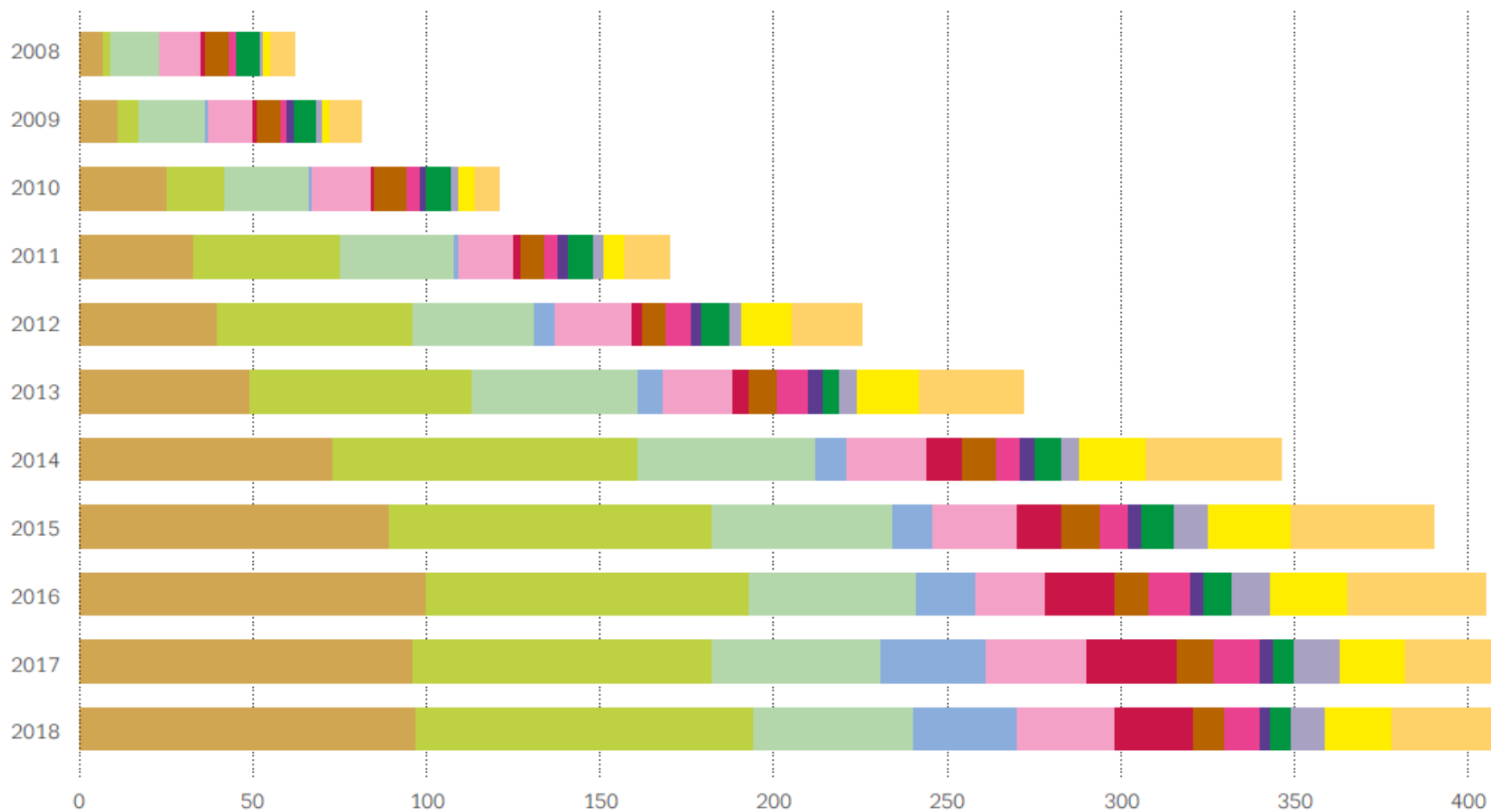
NUMERO E CATEGORIE DELLE NUOVE SOSTANZE PSICOATTIVE SEGNALATE PER LA PRIMA VOLTA AL SISTEMA DI ALLERTA PRECOCE DELL'UE, 2008-2019



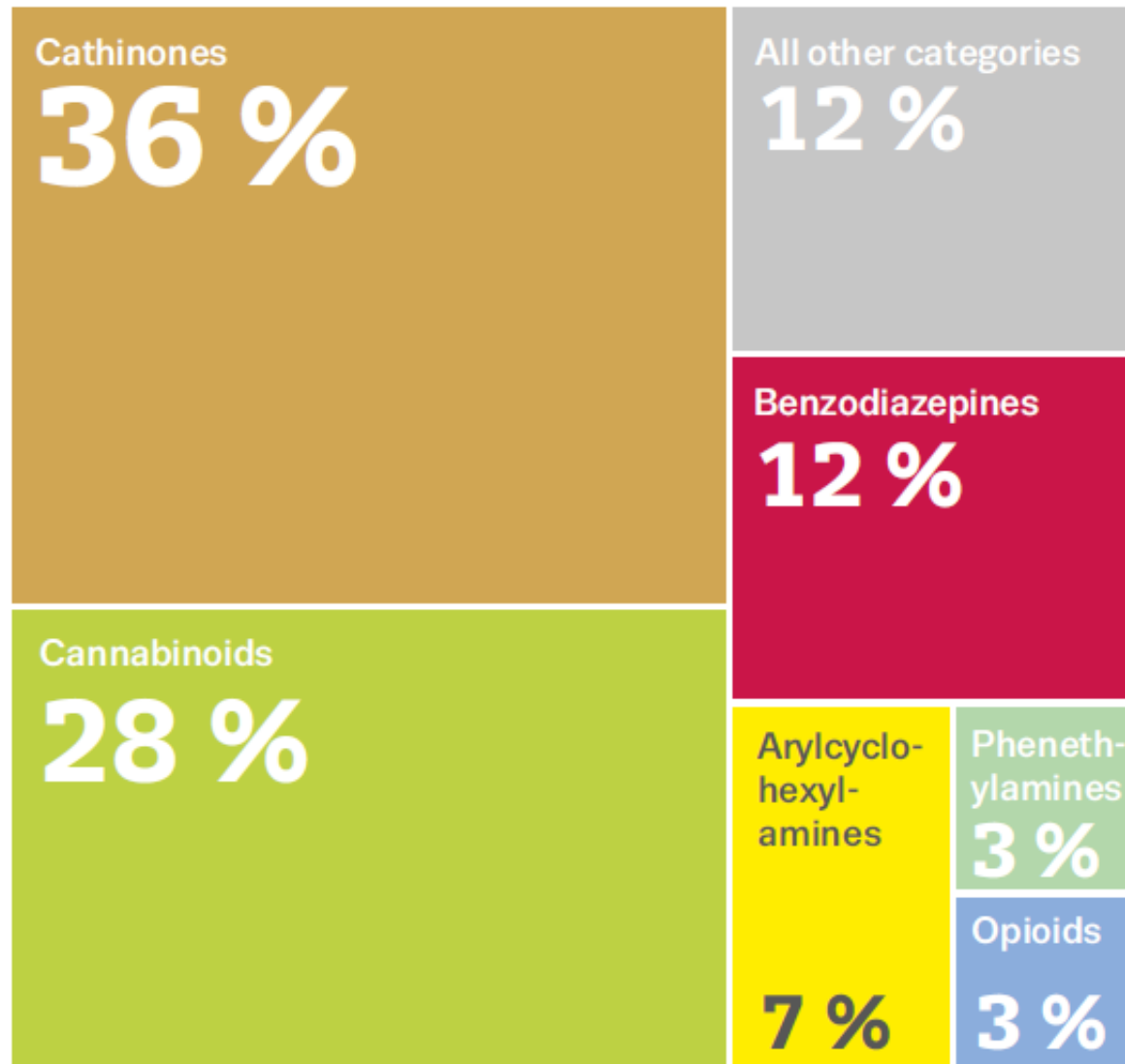
29/04/2022

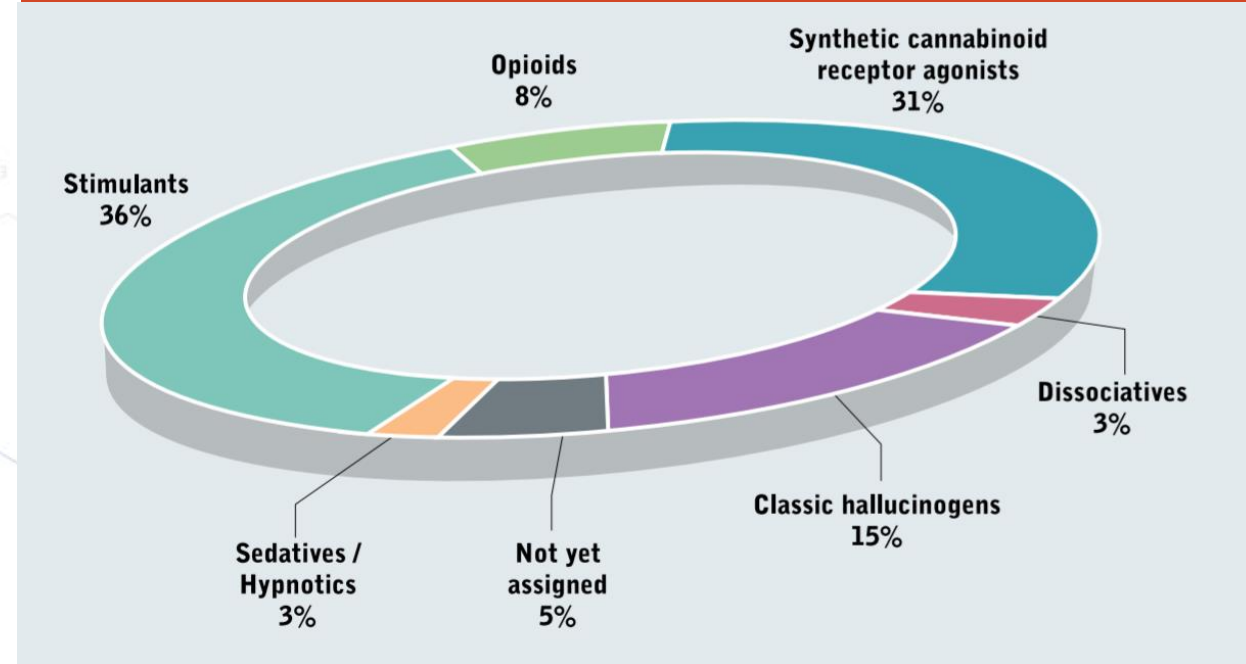
■ Cattoni
 ■ Cannabinoidi
 ■ Fenetilamine
 ■ Oppiacei
 ■ Triptamine
 ■ Benzodiazepine
 ■ Piperazine
 ■ Arilalchilamine
■ Aminoindani
■ Piante ed estratti
■ Piperidine e pirrolidine
■ Arilcicloexilamine
■ Altre sostanze

NUMERO E CATEGORIE DELLE SOSTANZE INDIVIDUATE OGNI ANNO DOPO LA PRIMA SCOPERTA, 2008-18



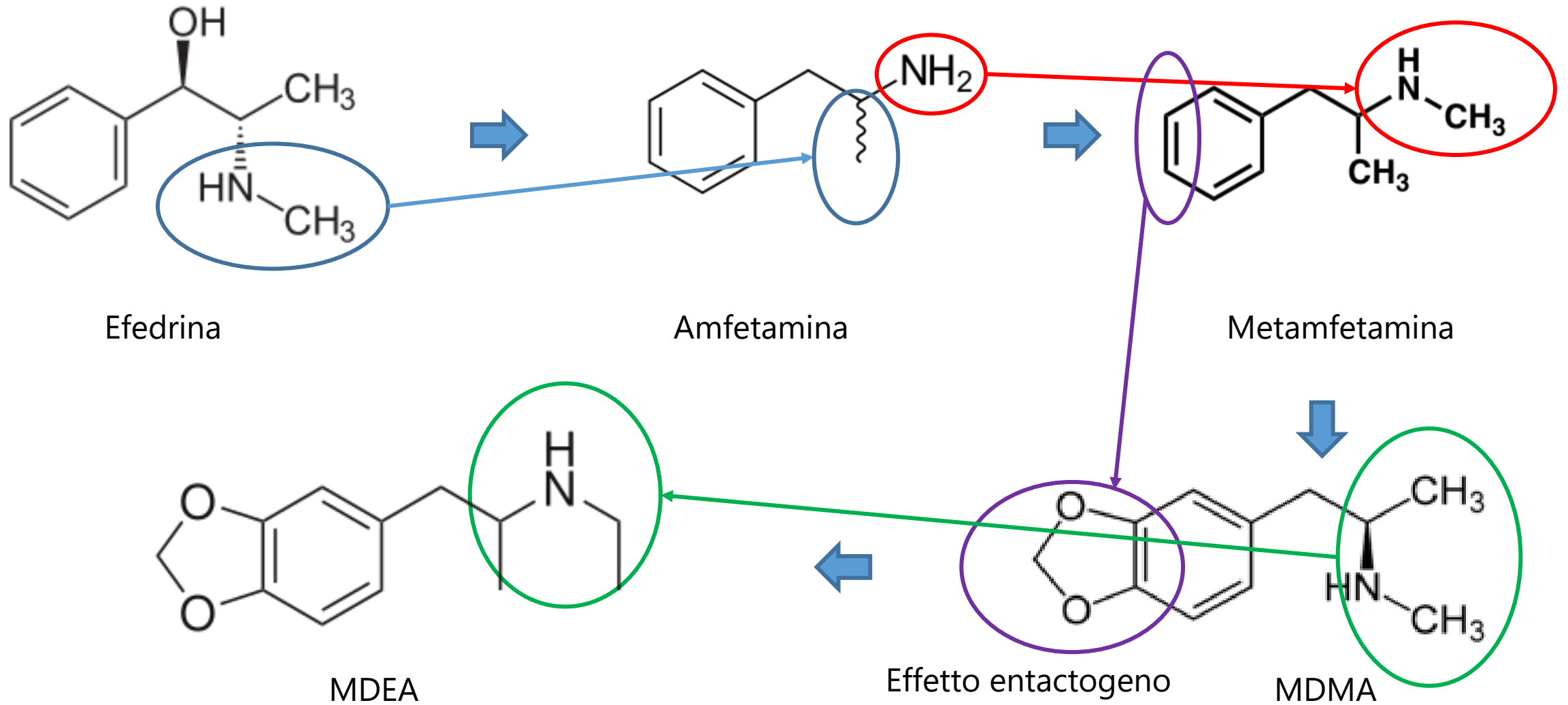
ANALISI DETTAGLIATA DEL NUMERO DI SEQUESTRI IN EUROPA SUDDIVISI PER CATEGORIA (2018)



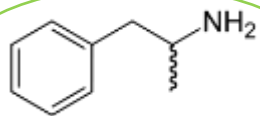


Classification provided by United Nations Office on Drugs and Crime - UNODC

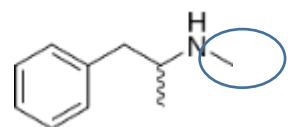
Esempio di modifiche su struttura base nota



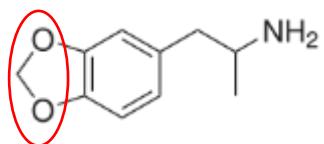
AMFETAMINE



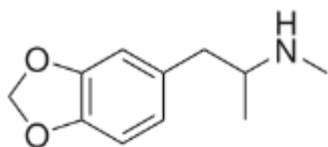
amfetamina



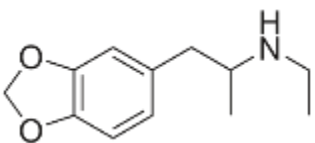
metamfetamina



MDA

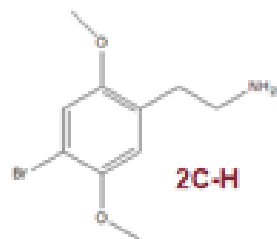


MDMA

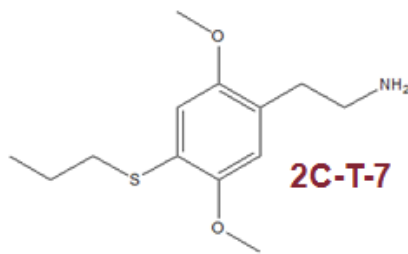


MDEA

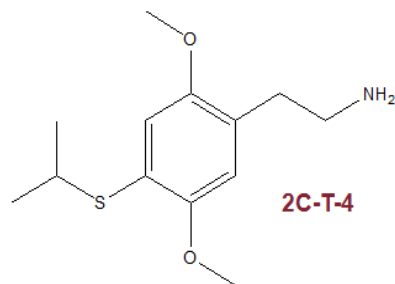
Fenetilammine



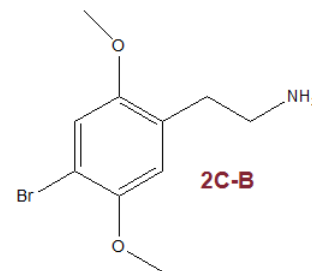
2C-H



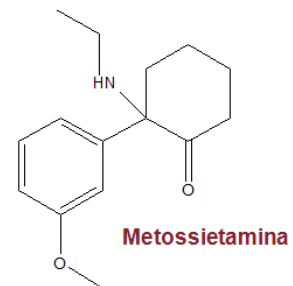
2C-T-7



2C-T-4

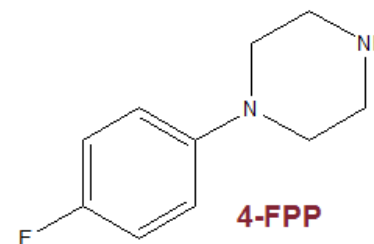


2C-B

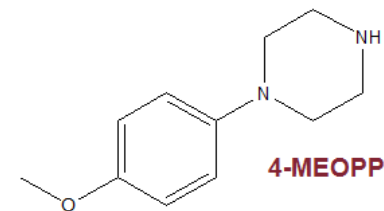


Metossietamina

Piperazine

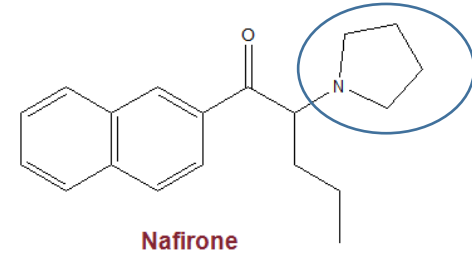
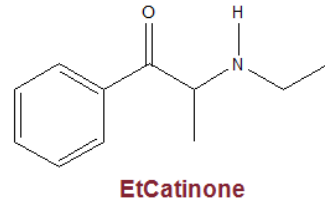
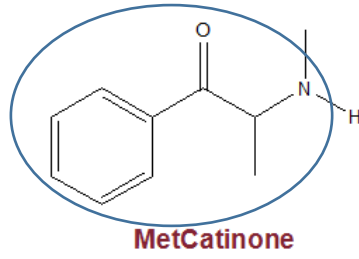
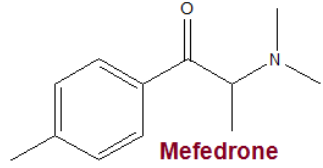


4-FPP

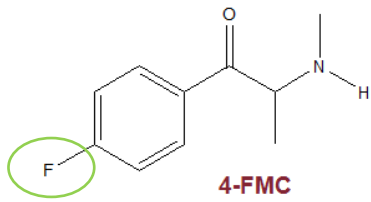
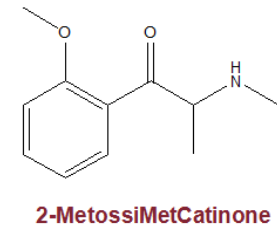
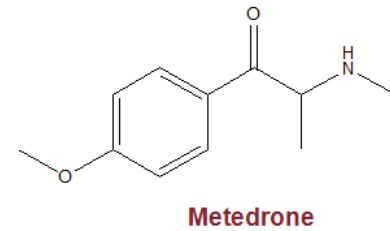
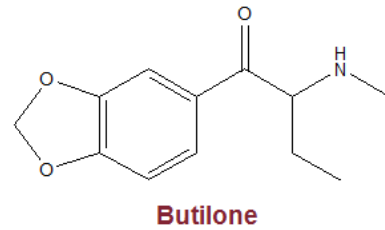
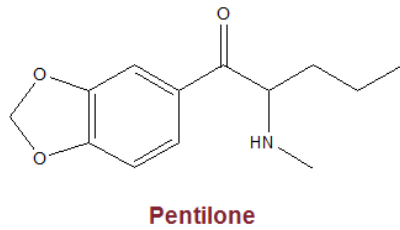
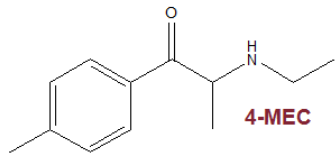
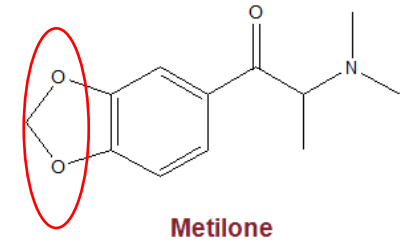
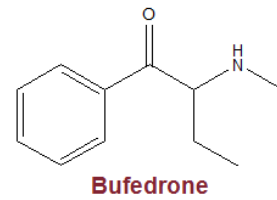
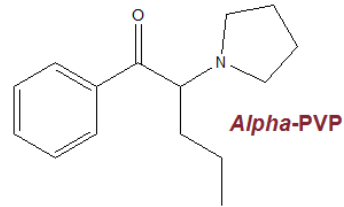
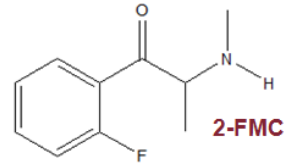
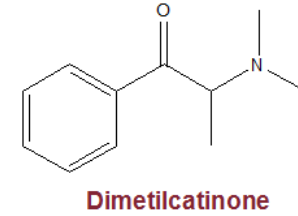
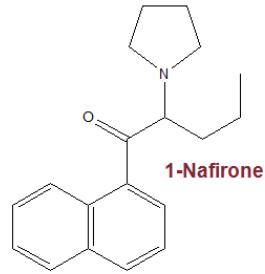
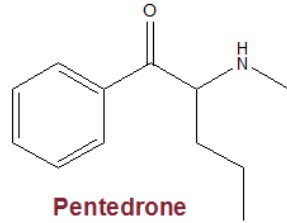
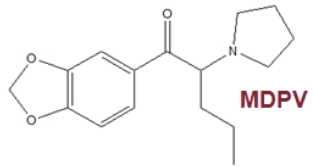


4-MEOPP

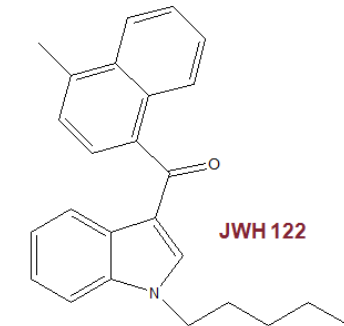
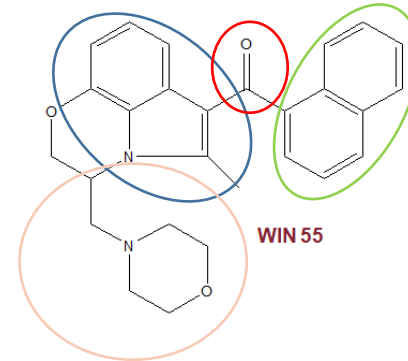
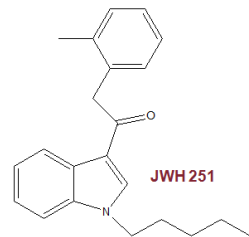
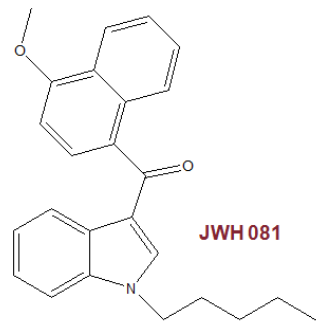
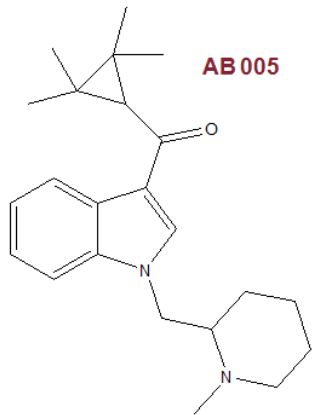
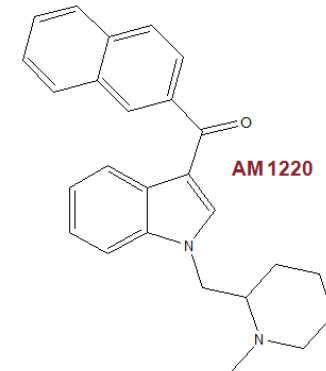
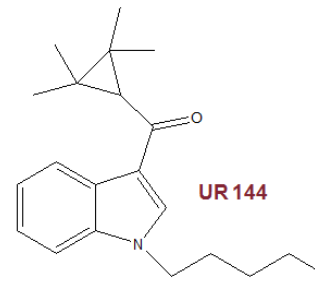
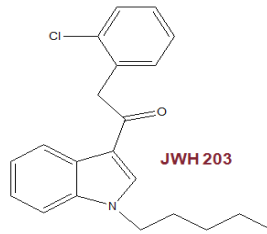
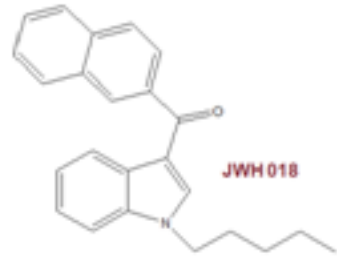
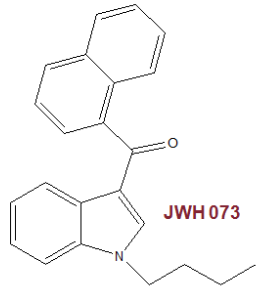
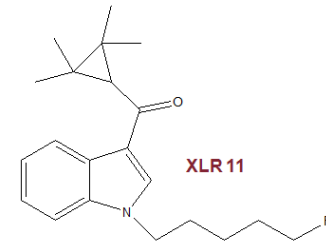
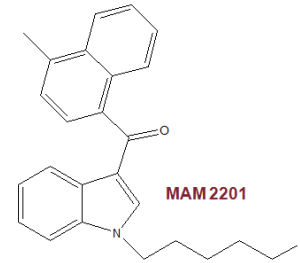
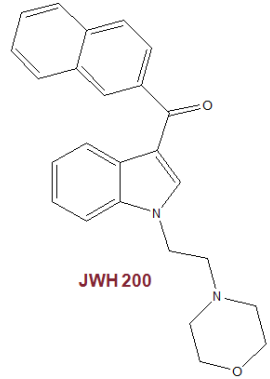
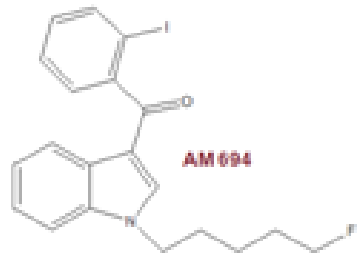
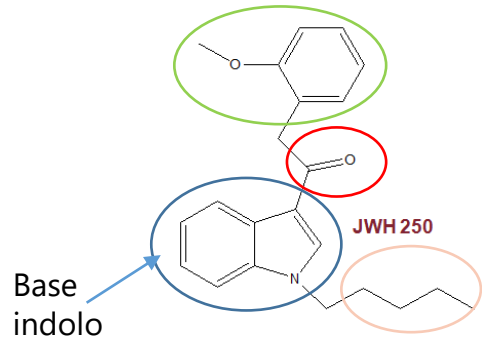
Cationi Sintetici



Pirrolo

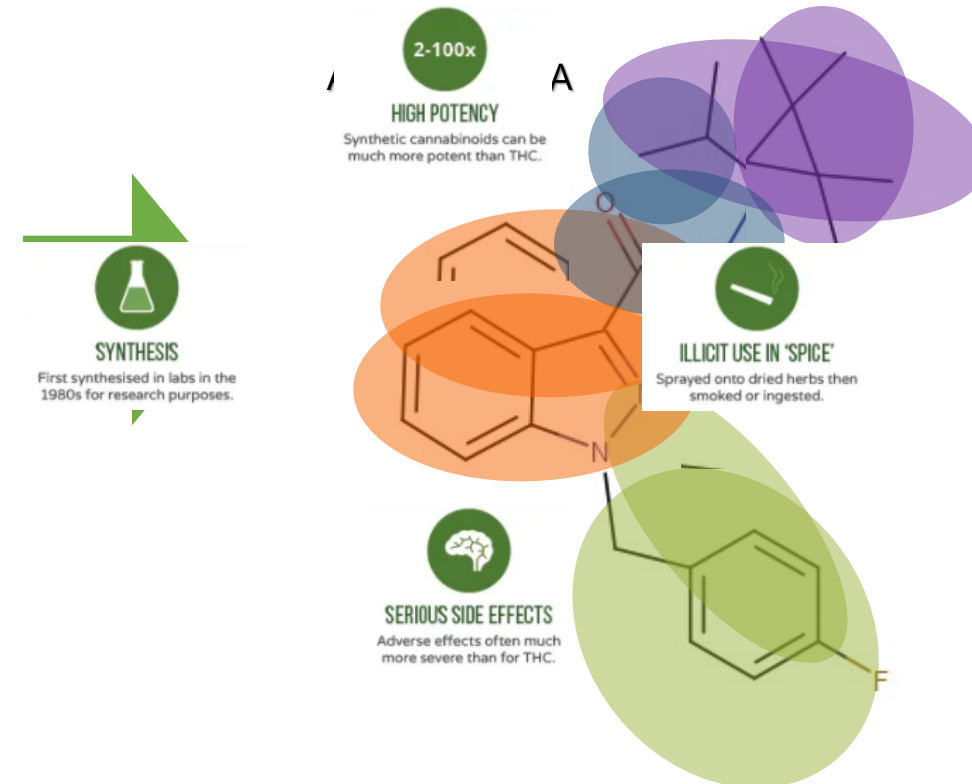
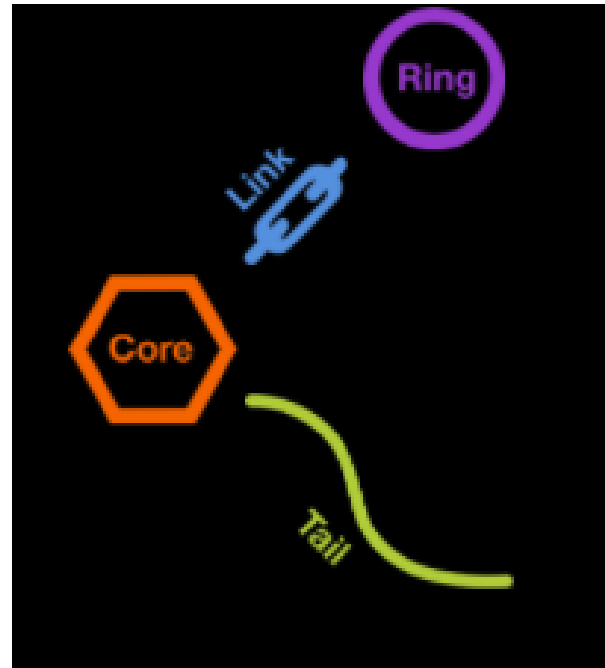


Cannabinoidi sintetici



Cannabinoidi sintetici

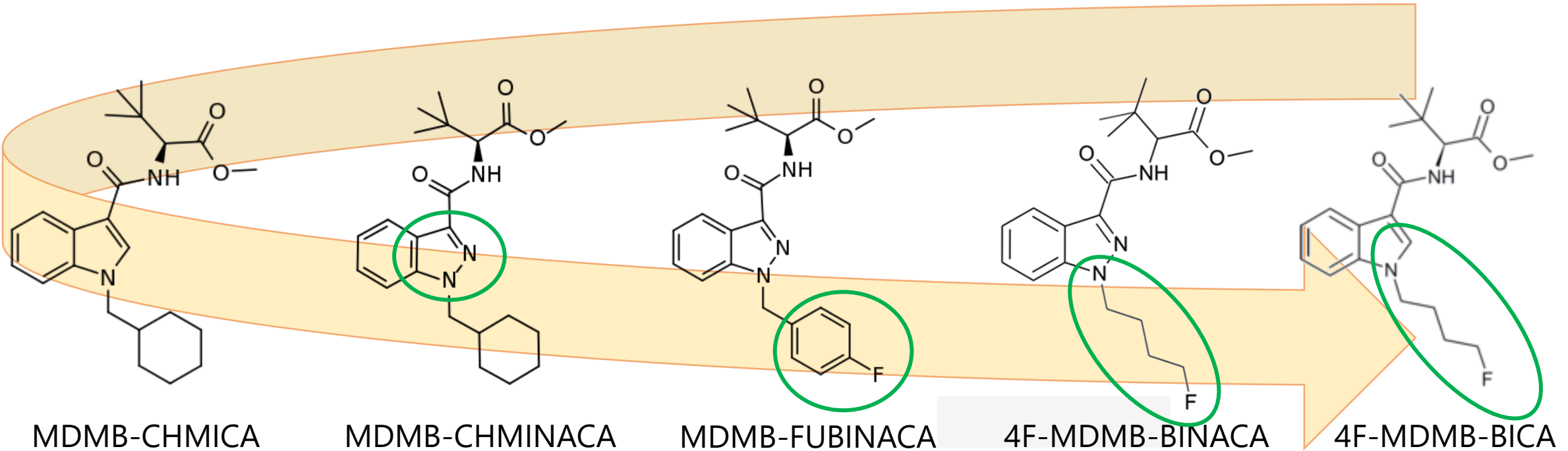
I Cannabinoidi sintetici sono un gruppo di sostanze che mimano gli effetti del (-)-trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), legandosi ai recettori CB nell'organismo umano



EMCDDA attualmente monitora circa 190 cannabinoidi sintetici

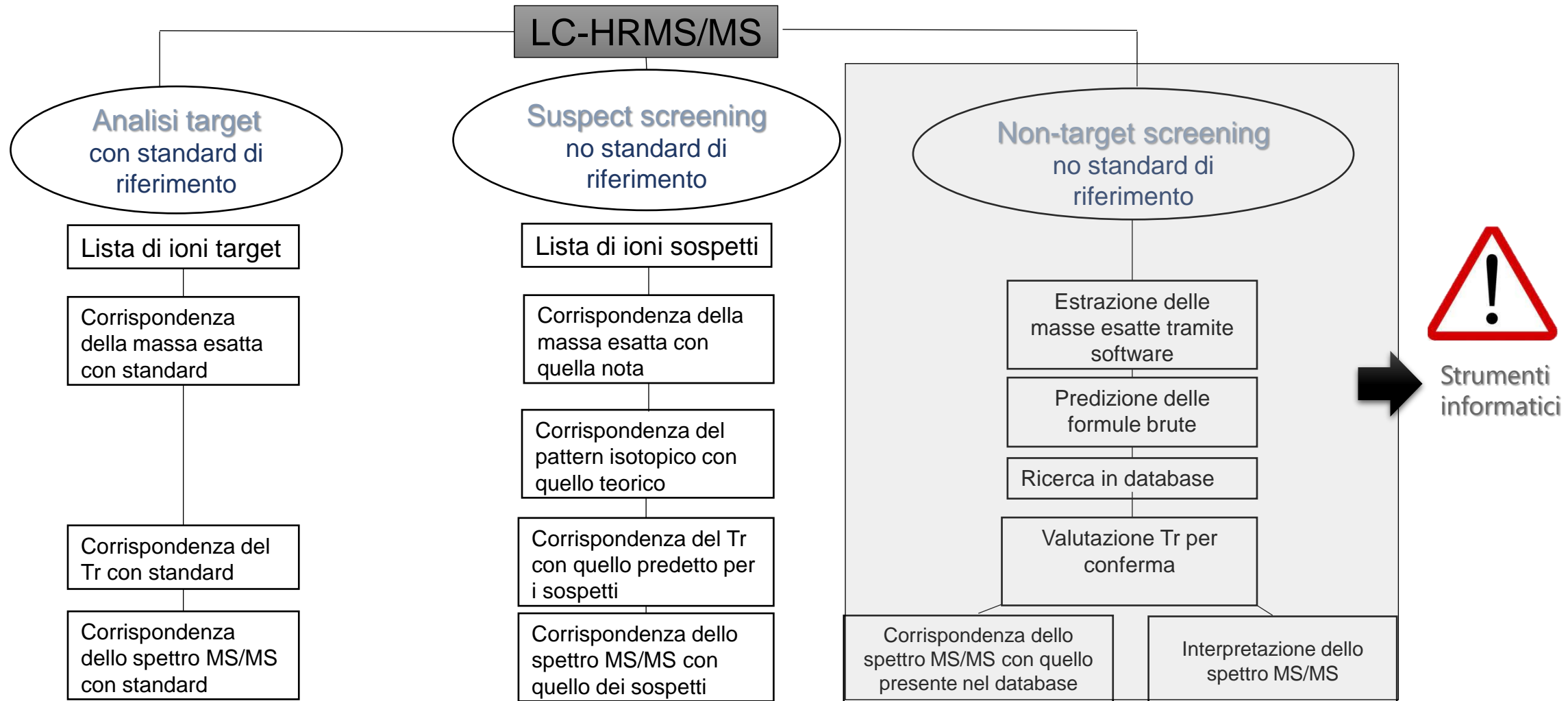
Esempio di modifiche su struttura base nota

Cannabinoidi sintetici CROSS-LINK fra diverse famiglie



https://www.emcdda.europa.eu/topics/pods/synthetic-cannabinoids_en

Workflow di analisi



[2] Pasin D., Cawley, A., Bidny, S., Fu, S., *Anal Bioanal Chem.* 409, 5821-5836 (2017)

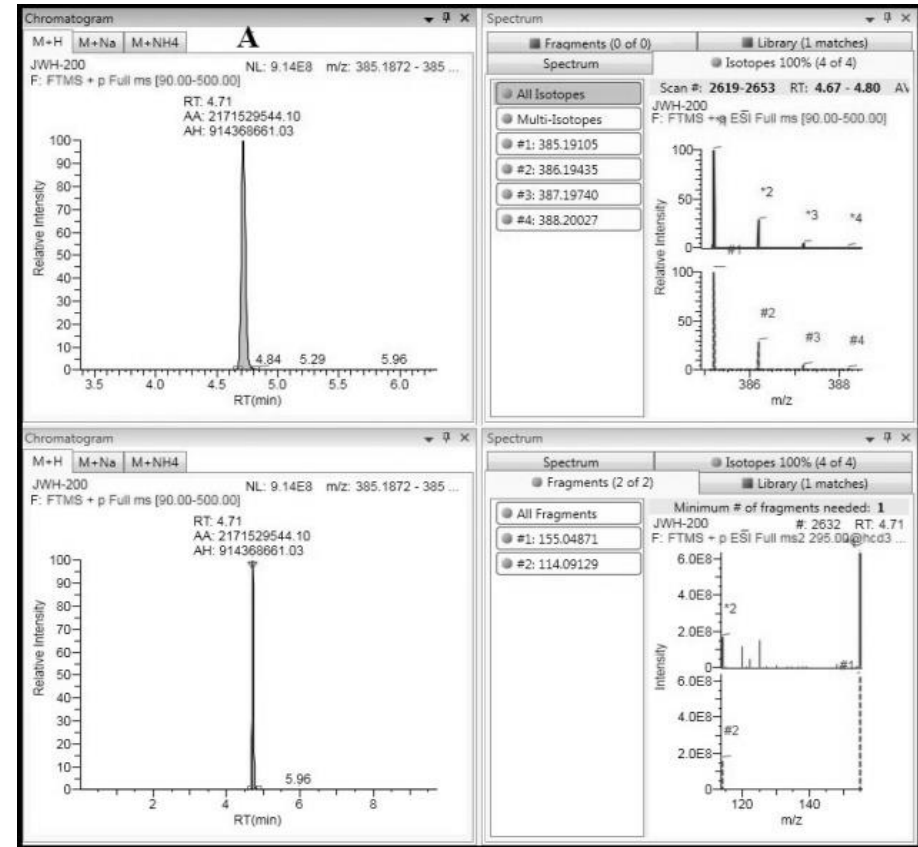
Analisi target

- ✓ Creazione di librerie attraverso l'analisi di standard di riferimento
 - Raccolta spettri MS/MS a diverse energie di collisione
 - Importazione dati nel software
 - Informazioni chimiche (CAS, IUPAC etc.)
 - Massa esatta
 - Pattern isotopico
 - Frammenti
 - Tr

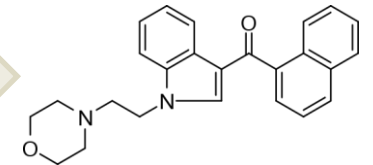
- ✓ Analisi campioni LC-HRMS (Full scan / DDA con lista di inclusione - PRM)

- ✓ Matching in libreria

- ✗ Si tratta di uno screening limitato alle sostanze presenti nella libreria, inadatto alla rivelazione ed identificazione di nuove droghe
- ✓ Screening, conferma e quantificazione simultanei (standard interni)
- ✓ Possibilità di reinterrogare i campioni analizzati



-R_t 4.71 min
-m/z 385.1910
- Frammenti 155.0487 e 114.0913



Suspect screening

✓ Creazione di un database da dati di letteratura, non sono necessari standard

➤ Importazione dati nel software

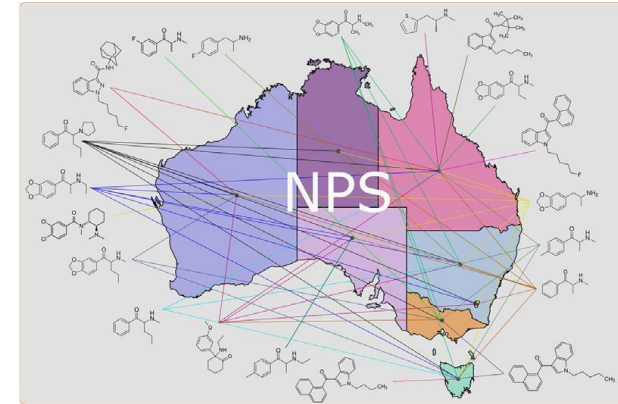
- Informazioni chimiche (CAS, IUPAC etc.)
- Massa esatta
- Pattern isotopico
- Frammenti
- Tr (eventuale)

✓ Analisi campioni LC-HRMS (Full scan/DDA, DIA, AIF)

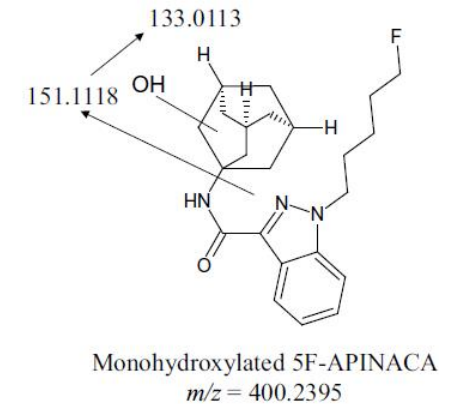
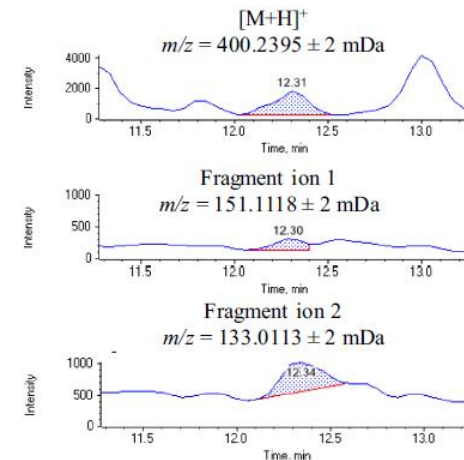
✓ Matching in database

✓ Post-target screening/Tentativo di identificazione

- ✗ Si tratta di uno screening limitato alle sostanze presenti nel database, inadatto alla rivelazione ed identificazione di nuove droghe
- ✗ Screening. Conferma richiede standard o analisi NMR
- ✓ Non sono necessari standard
- ✓ Possibilità di reinterrogare i campioni analizzati



- Monitoraggio di NPS nelle acque di scarico Australiane, 187 droghe sono incluse nel database. Sono state rilevate 22 NPS



Non target screening

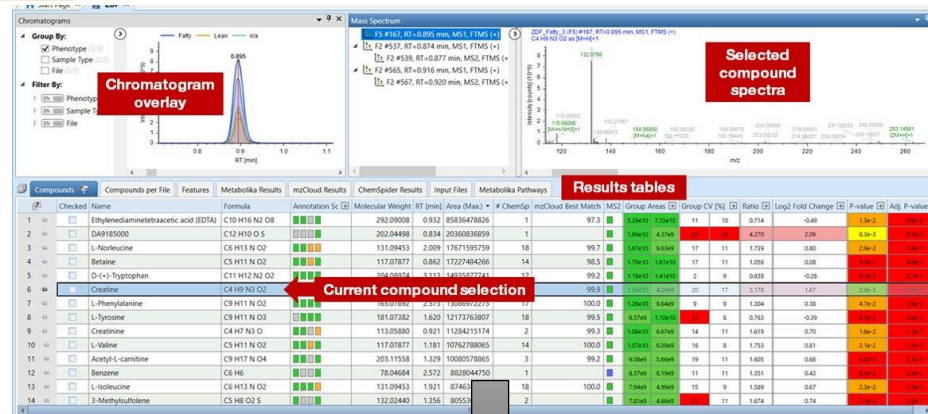
✓ Rivelazione e identificazione di composti in assenza di informazioni a priori

✓ Analisi campioni LC-HRMS (Full scan/DDA, DIA, AIF)

Biased non target screening
Identificazione di nuovi composti correlati a NPS esistenti

✓ Analisi visiva (sequestri)
✓ Estrazione delle features tramite software (anche disponibili online)

Unbiased non target screening
più difficile da realizzare



- ✗ Screening. Conferma richiede standard o analisi NMR
- ✗ Molecole presenti possono non essere rilevate per scarsa sensibilità o difficoltà nel discriminarle dai componenti della matrice

✓ Tentativo di identificazione sfruttando formula bruta e spettri MS/MS. Spettri in silico

- Mass defect filtering
- Molecular networking
- Analisi differenziale
- Precursor ion searching
- Neutral loss filtering

- ✓ Possibilità di identificare (putativamente) nuove sostanze
- ✓ Possibilità di reinterrogare e applicare diverse strategie informatiche allo stesso campione
- ✓ Condivisione online dei dati spettrali di nuove sostanze individuate

Precursor ion searching – Neutral loss filtering

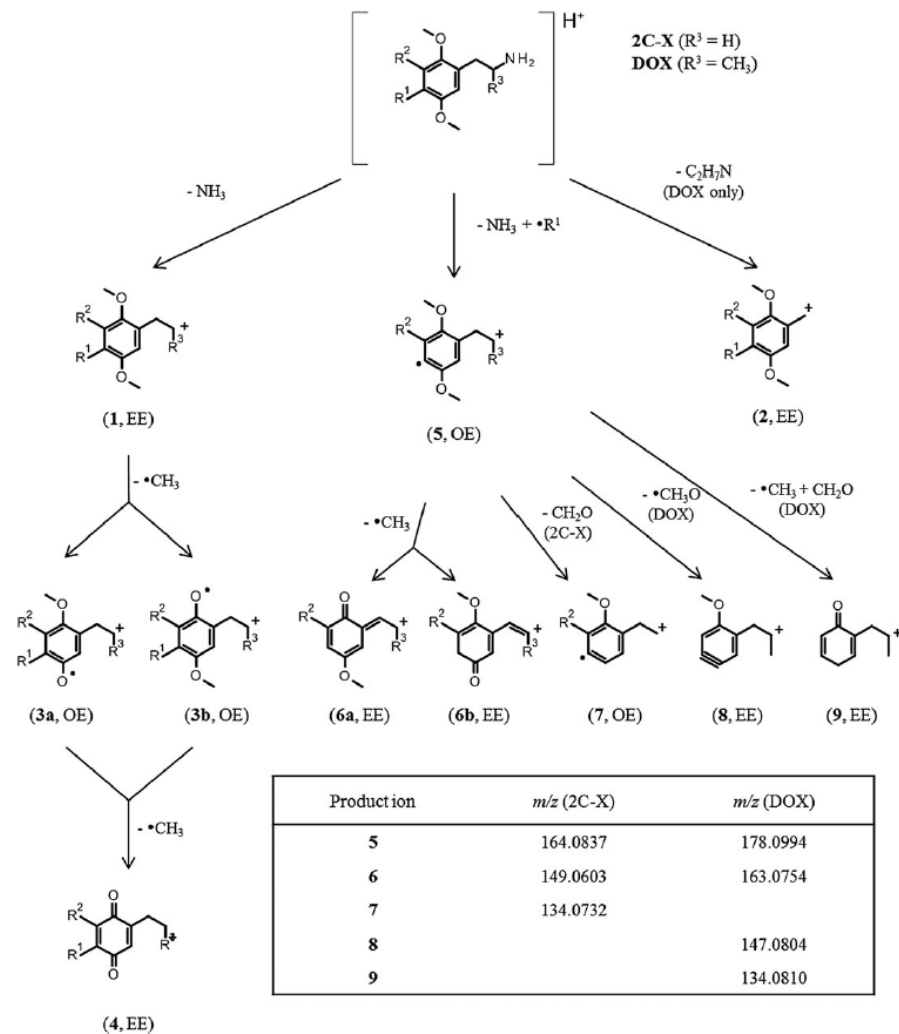
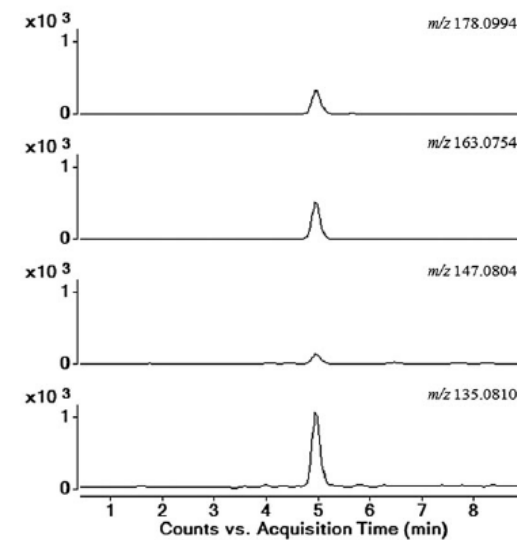


Figure 1. CID pathways for 2C-X and DOX derivatives at 20 eV.

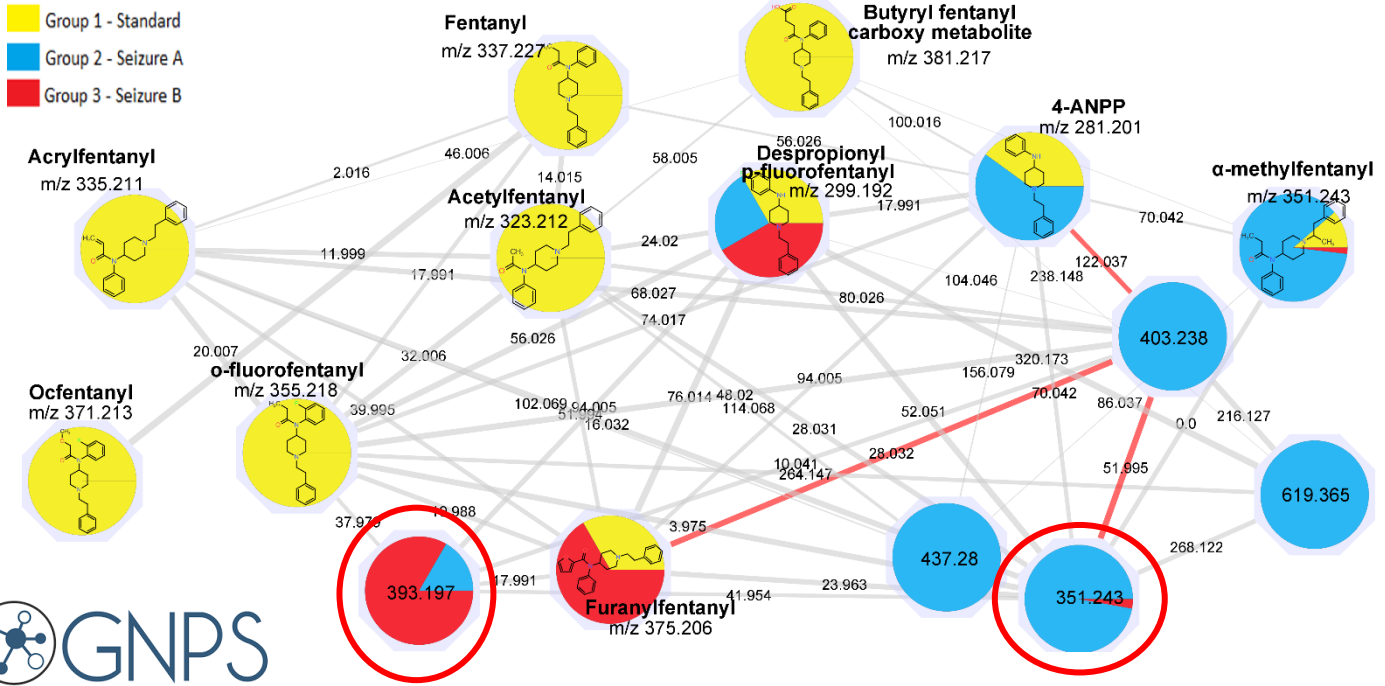
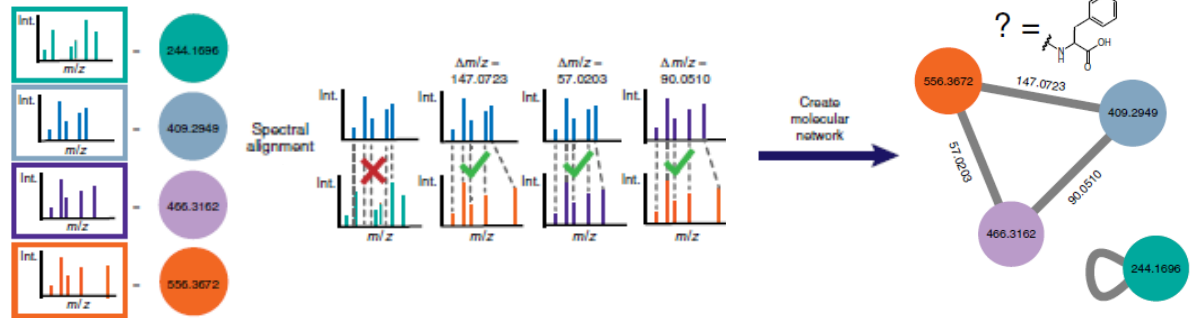
Questa strategia tiene conto del fatto che molecole appartenenti alla stessa classe chimica hanno spettri di frammentazione simili, con frammenti e/o perdite neutre comuni

- ✓ I campioni possono essere acquisiti in modalità DDA o DIA
- ✓ PIS può essere fatto manualmente NLF è una funzione disponibile in vari software

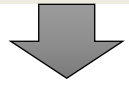


Molecular networking

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.



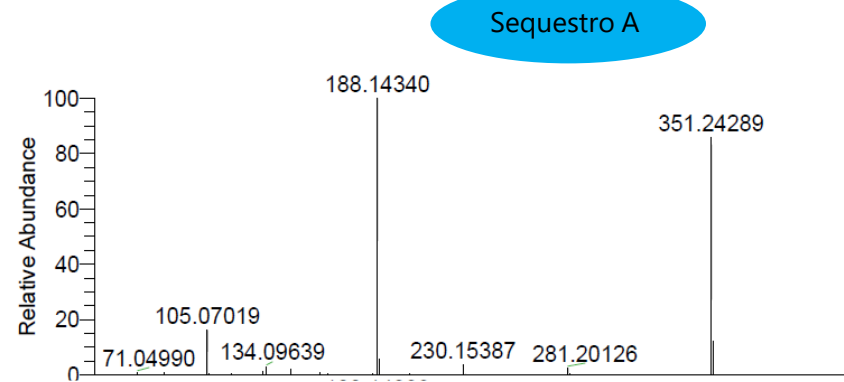
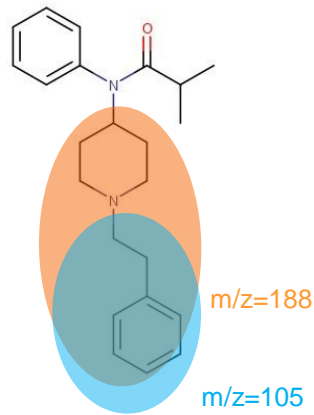
- ✓ Raccolta di spettri MS/MS di standard analitici appartenenti a classi note e creazione di «network standard» (nodi in giallo)
- ✓ Analisi di campioni incogniti sfruttando la molecular networking analysis; gli spettri che presentano analogie con quelli standard vengono messi in evidenza (nodi blu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



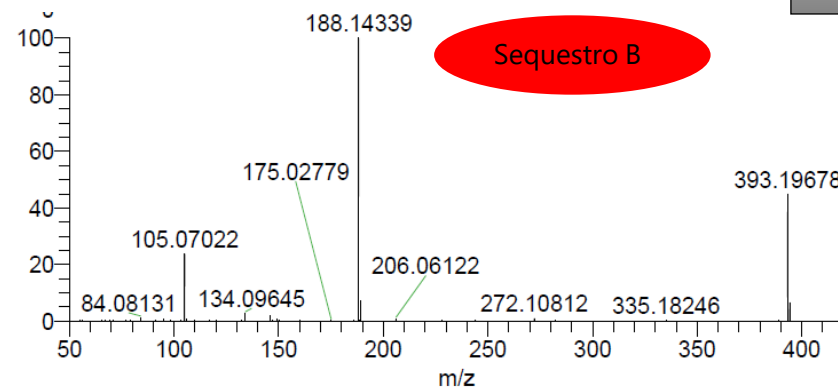
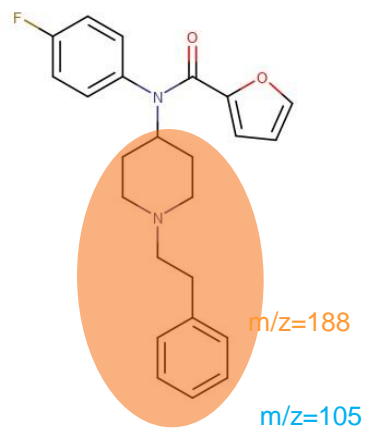
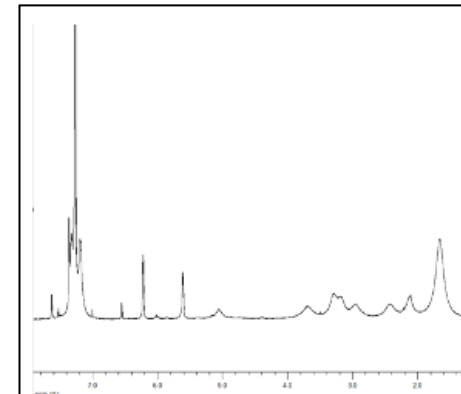
Identificazione di due nuovi analoghi del fentanyl in due sequestri



Molecular networking



CONFERMA
ATTRAVERSO ANALISI
NMR



Front. Chem. (2020) doi: 10.3389/fchem.2020.572952

Conclusioni

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

FINE...

