

# TECNICHE CROMATOGRAFICHE ACCOPPIATE ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA

14-03-2023

## Sostanze Psicoattive





## 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 **cocaina**, 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.



## PIACERI CHE DIVENTANO UNA SCHIAVITÀ

“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*

aggiornato, da ultimo, con le modifiche apportate dal **D.M. 13 febbraio 2023**, a decorrere dal 10 marzo 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

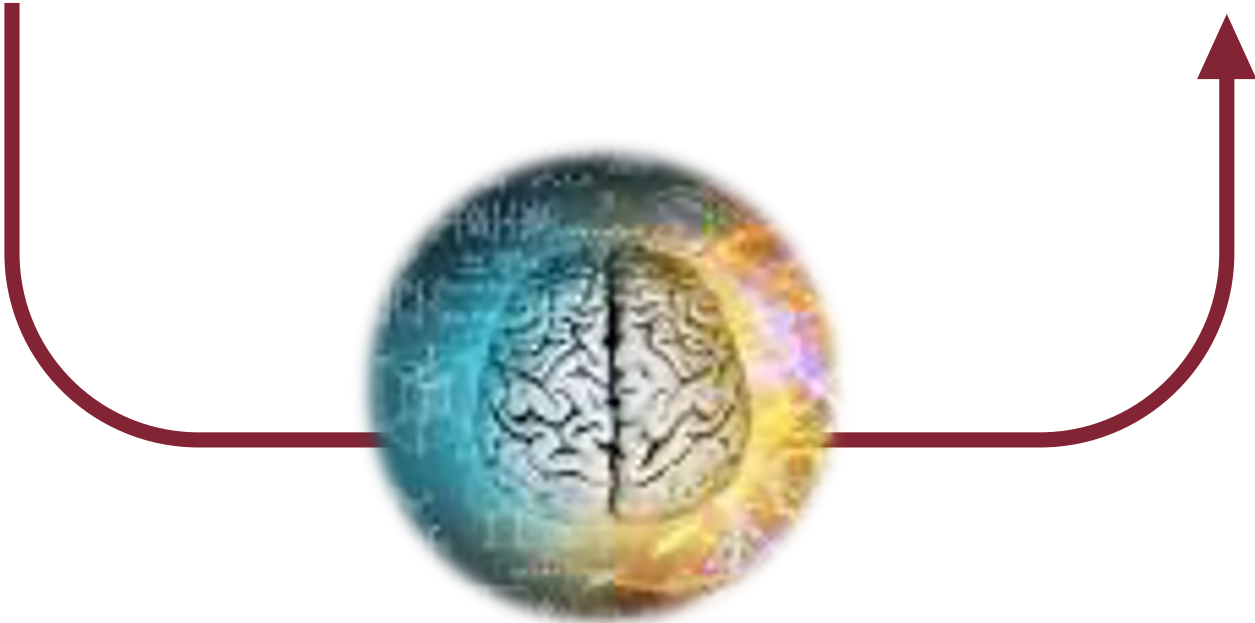
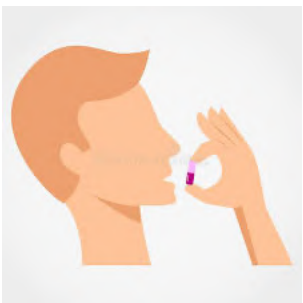
Medicinali di origine vegetale a base di Cannabis

Barbiturici

Benzodiazepine (diazepam, flunitrazepam, lorazepam ecc.)



# Metabolismo delle sostanze psicoattive



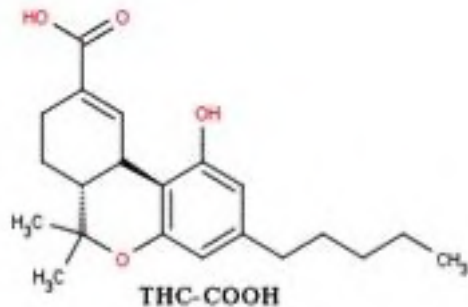
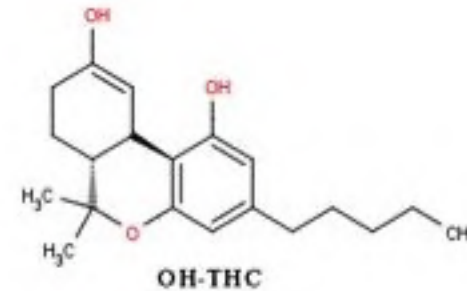
i prodotti del processo di trasformazione che subisce la sostanza inserita nel nostro sistema e che ha la funzione di renderla più facilmente assorbibile o eliminabile.



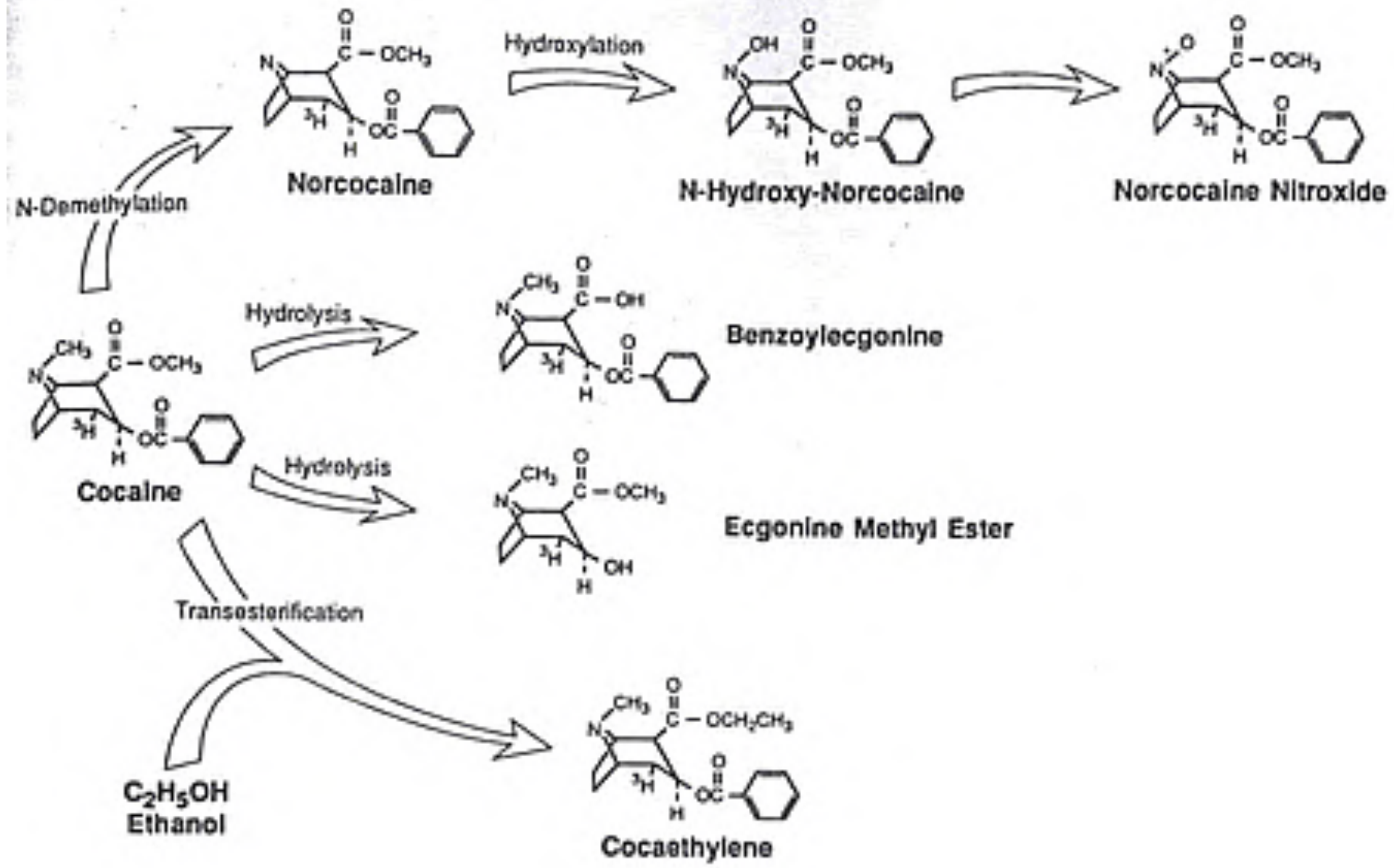
Il THC viene rapidamente metabolizzato nel fegato.



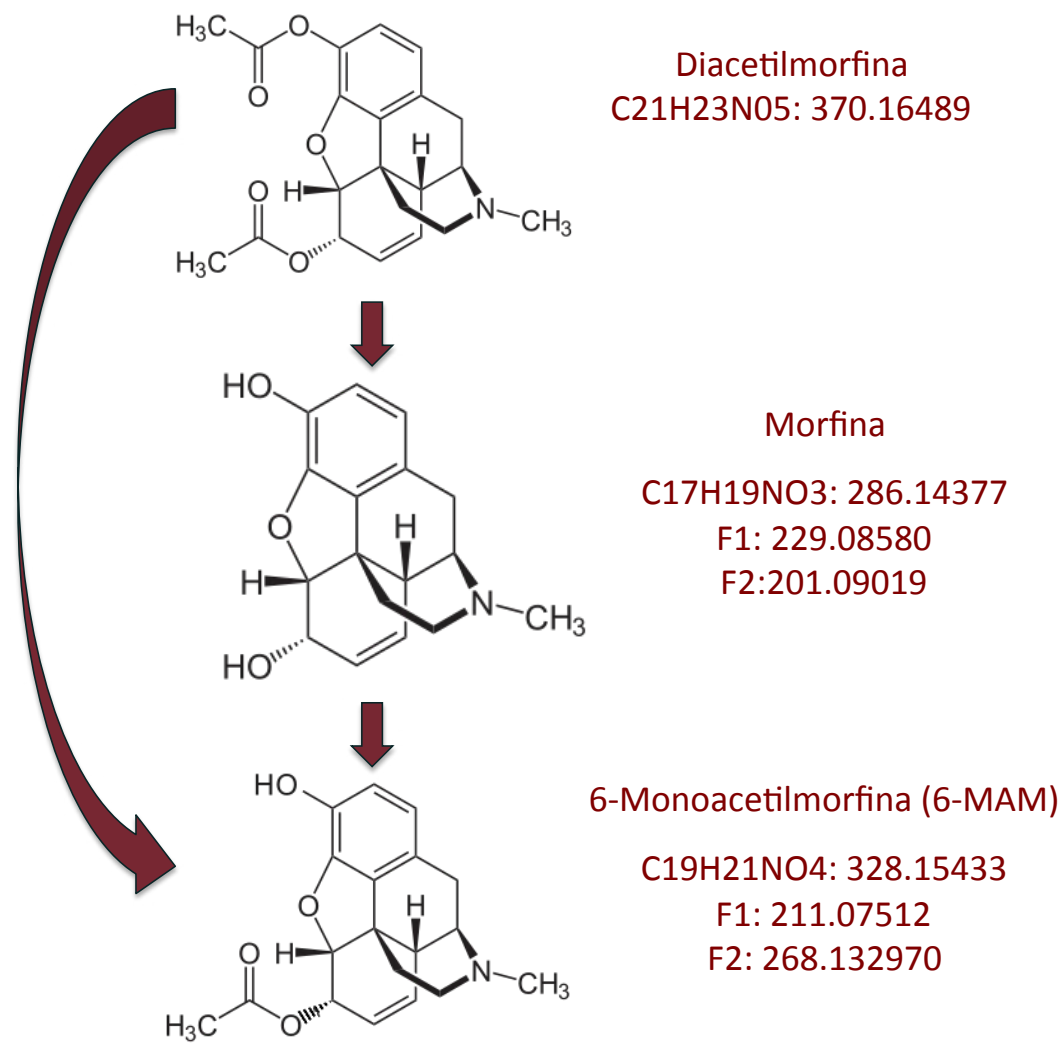
11-idrossi tetraidrocannabinolo (OH-THC):  
principale metabolita psicoattivo in grado di  
superare rapidamente la barriera encefalica



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









## Metaboliti

## Biomarkers di assunzione



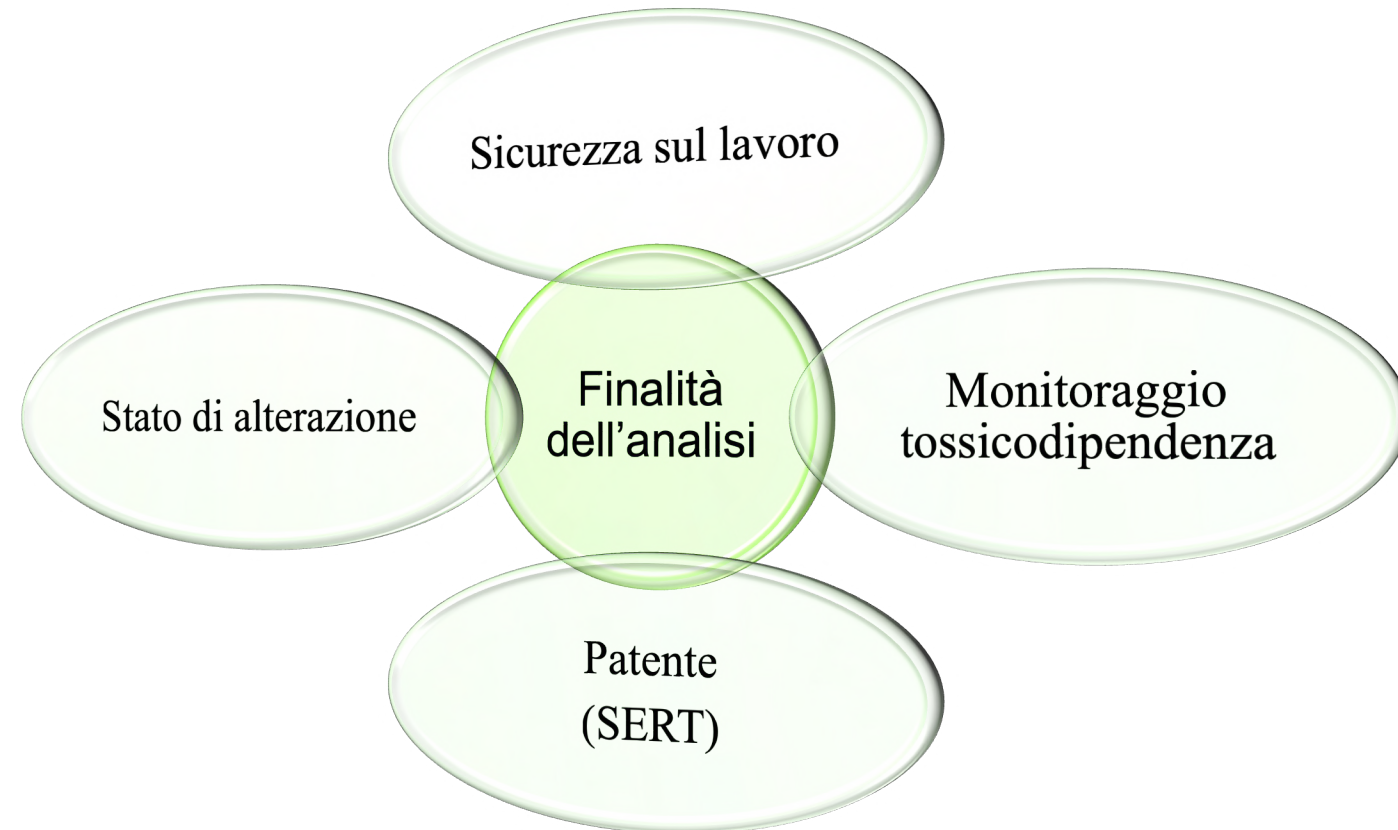
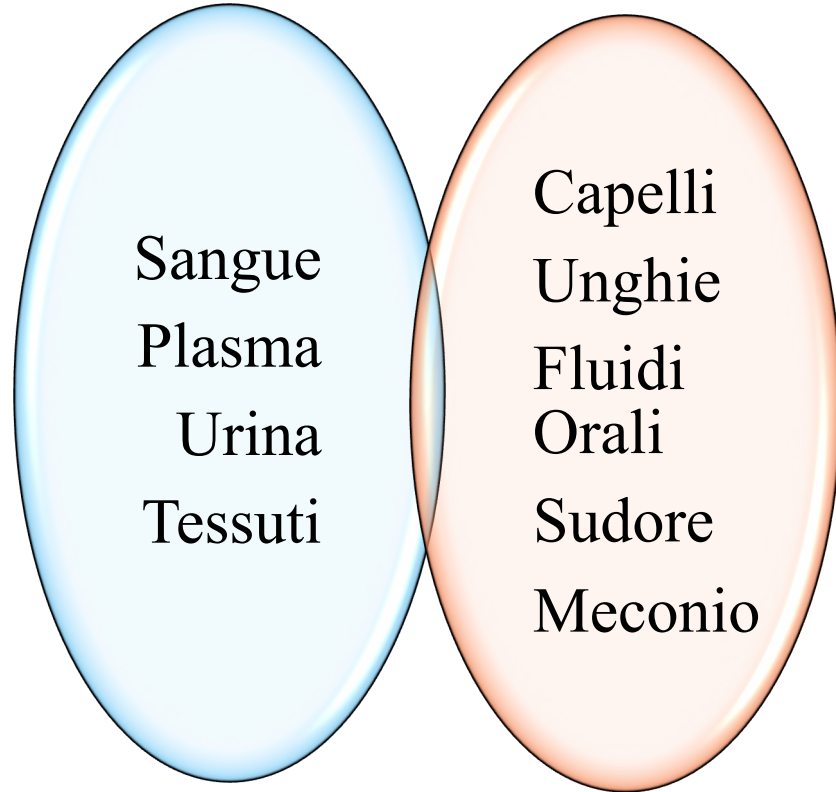
Tutte quelle sostanze che possono essere considerate analiti target nel metodo e che consentono di discriminare tra l'assunzione e il contatto passivo con la molecola parent

urina  
feci  
sudore  
lacrime  
  
Capelli  
Sangue  
Saliva

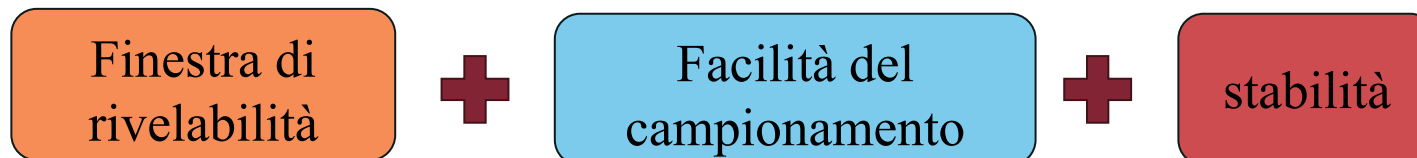
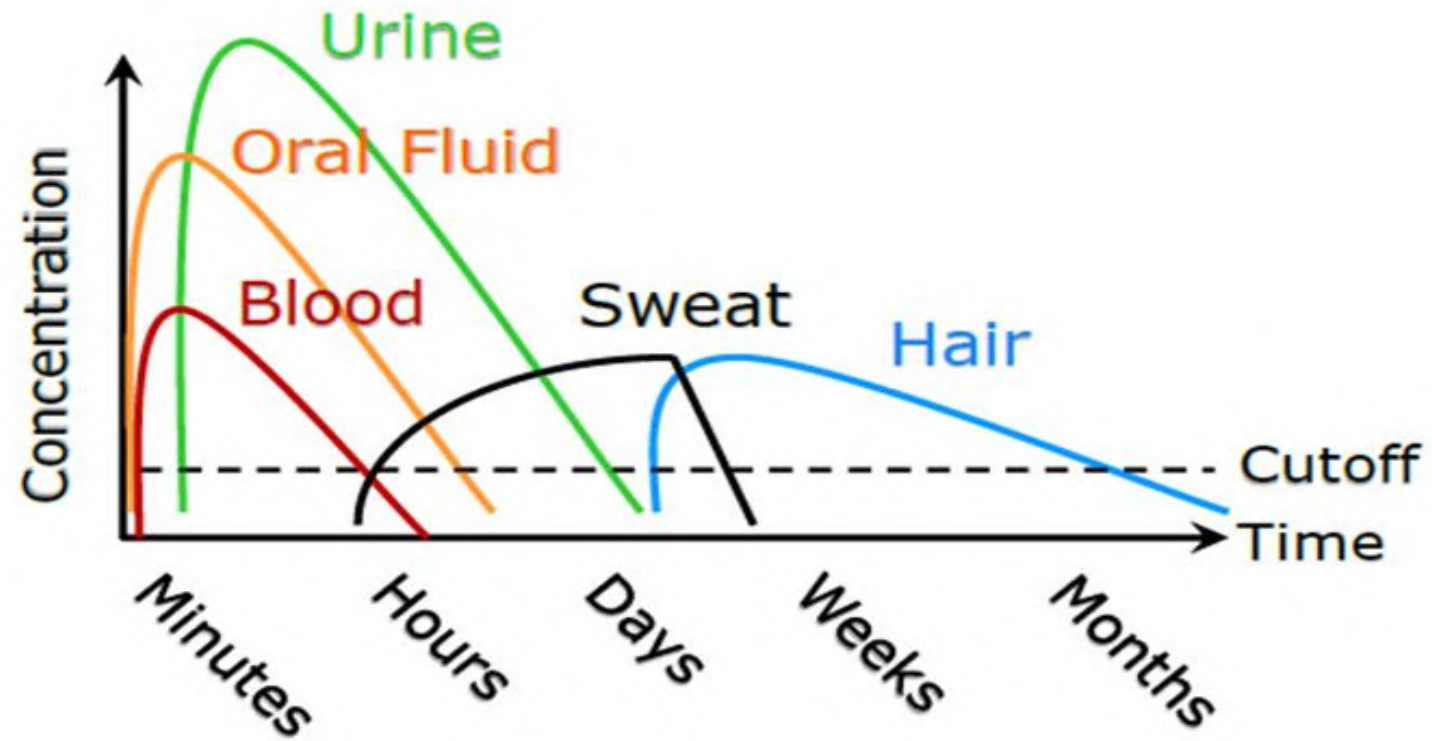
***Come si può stabilire se il soggetto ha assunto sostanze psicoattive?***

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.



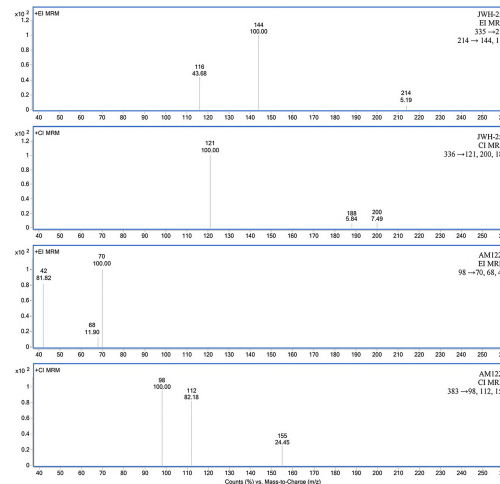
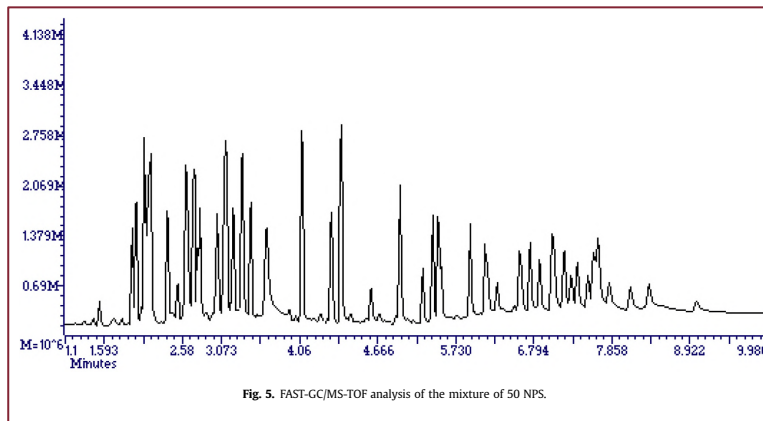
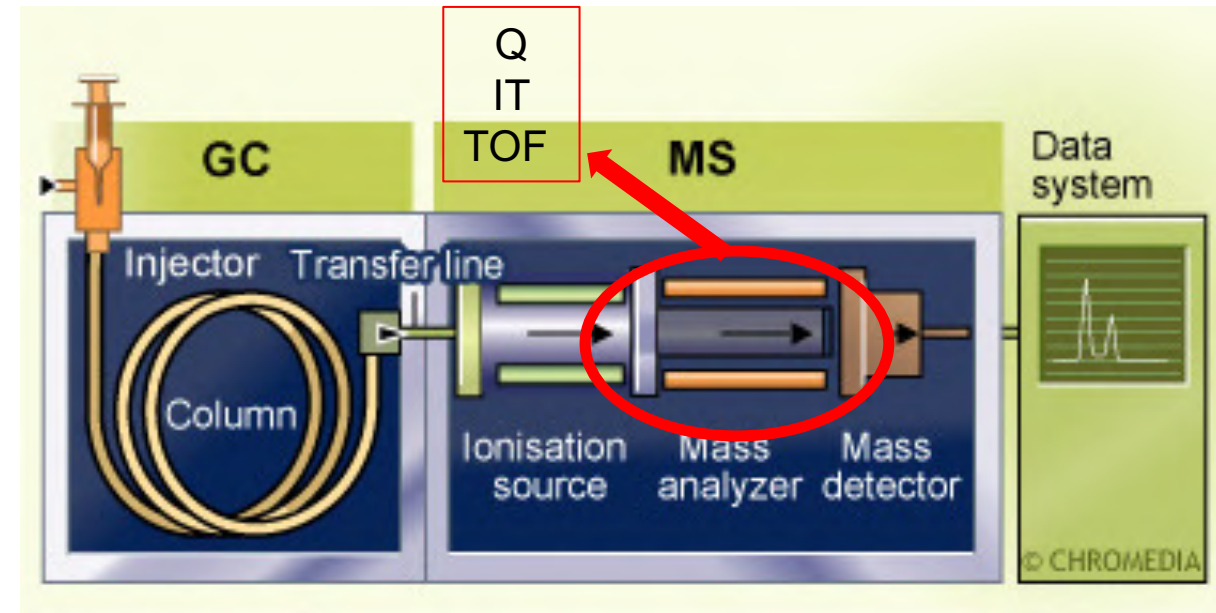
Modalità di acquisizione:

### Full scan (FS)

Ampio range m/z  
Scansione lunga  
Bassa sensibilità

### Selected Ion Monitoring (SIM)

Range di m/z ristretto (o singolo)  
Scansione breve  
Alta sensibilità



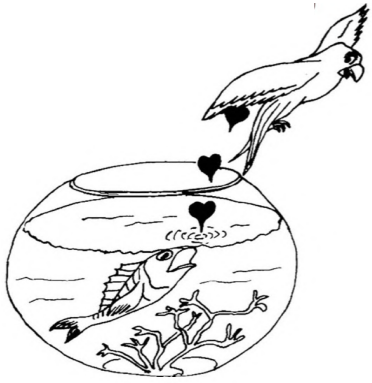
### Identificazione:

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

Standard

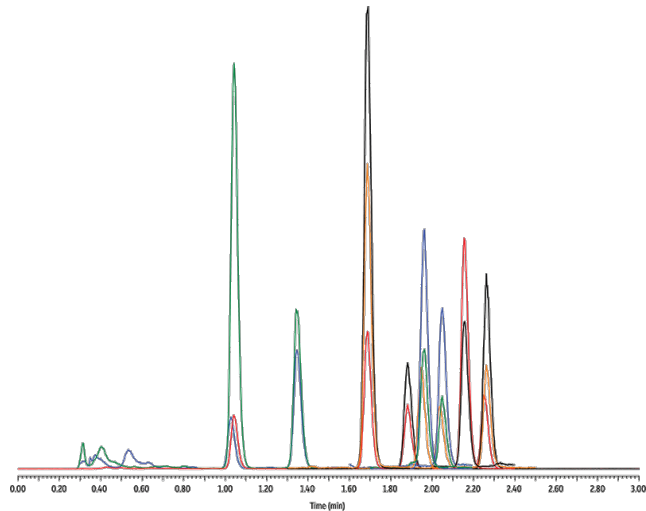
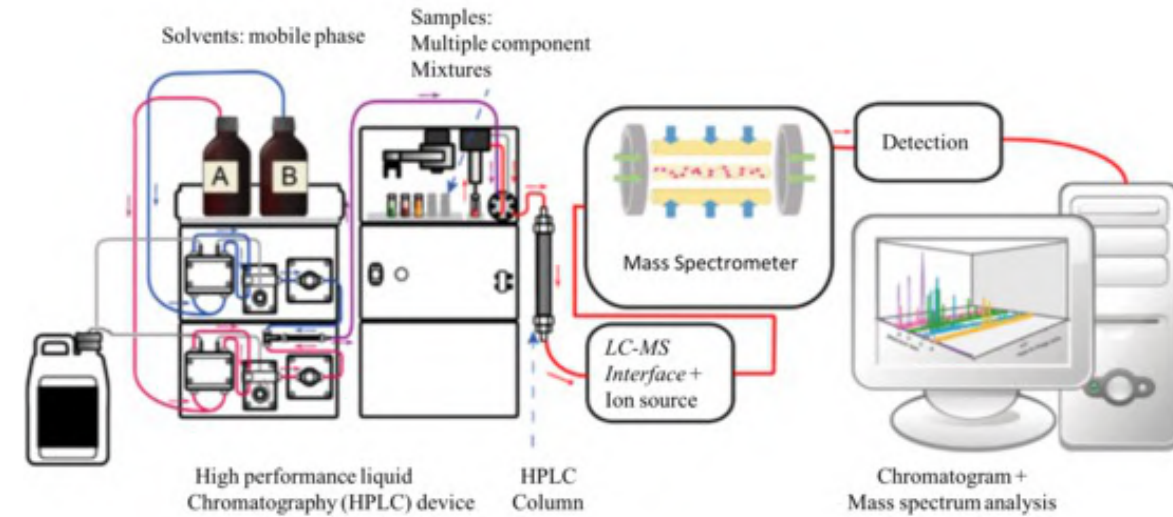
Banca Dati

# Conferma HPLC-MS(/MS)



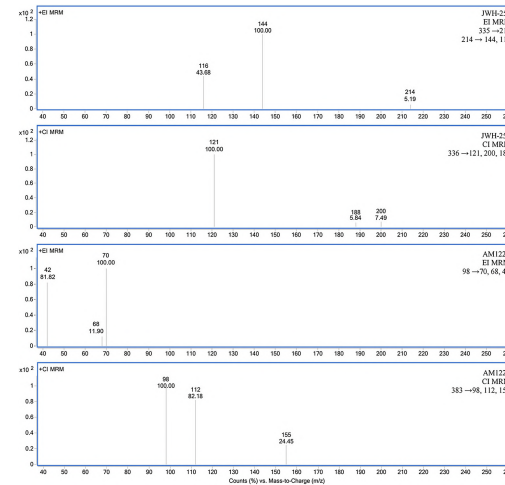
## Identificazione:

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



Standard

Banca Dati



**MS**

**MS/MS**

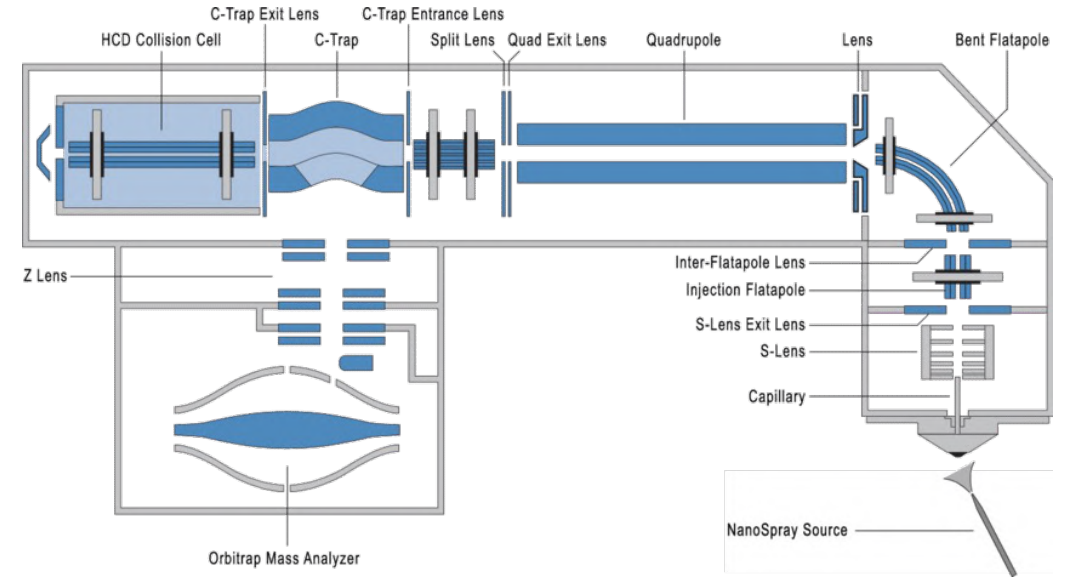
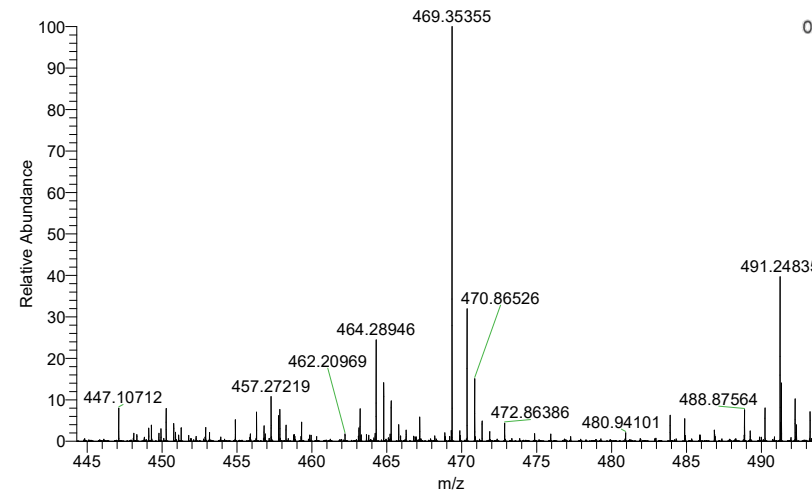
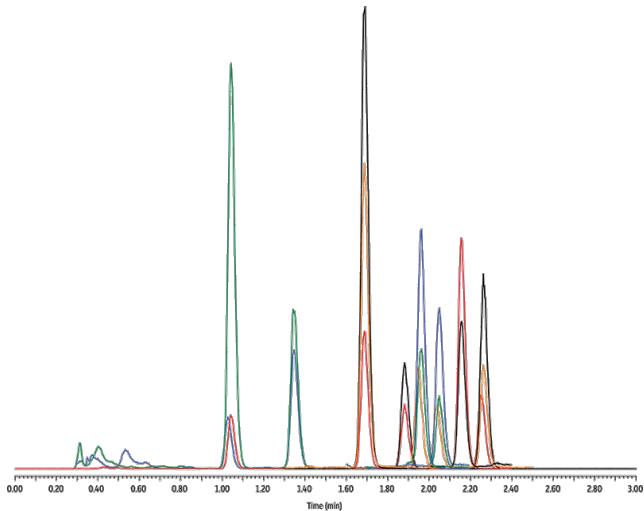
**MS<sup>n</sup>**

## Targeted, Semi-Targeted, Suspect

# Conferma HPLC-HRMS(/MS)

## 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





## Sub Campionamento

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

## Lavaggio o decontaminazione

- Procedura necessaria su campioni solidi in particolare i 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)





Matrici



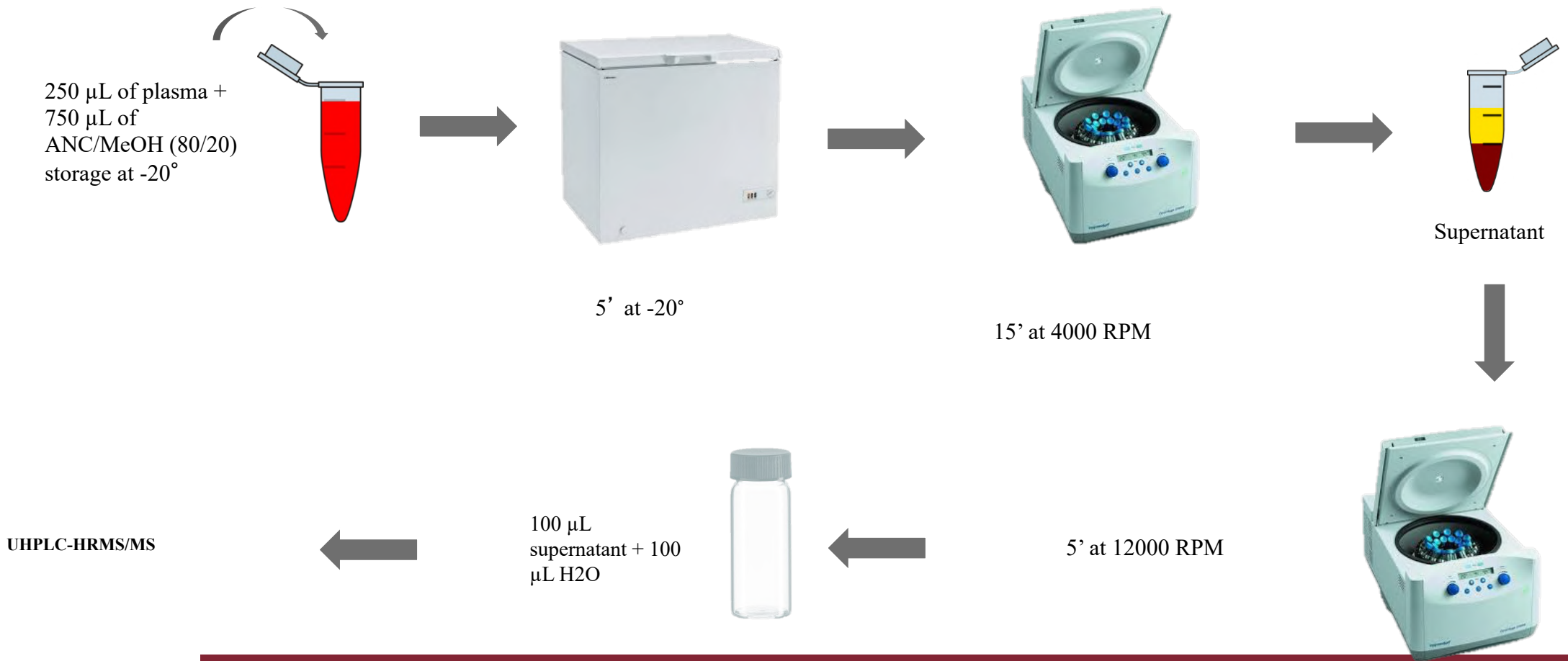
Tecniche

Qualche esempio di protocolli analitici

Drugs' extraction from Blood

Protein precipitation

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



## Blood analysis

Sample  
preparation



Protein precipitation (PPT)

Liquid  
Chromatography

Dionex UltiMate 3000 Rapid Separation LC system  
Thermo Fisher Scientific equipped with 100  $\mu$ L loop and  
degasser



- BetaBasic18 column 150x2,1 mm with 5  $\mu$ m particles
- Phases: - H<sub>2</sub>O 0,1% HCOOH  
- ACN 0,1% HCOOH

Mass Spectrometry

Q-Exactive-Orbitrap Thermo Fisher Scientific with H-ESI source



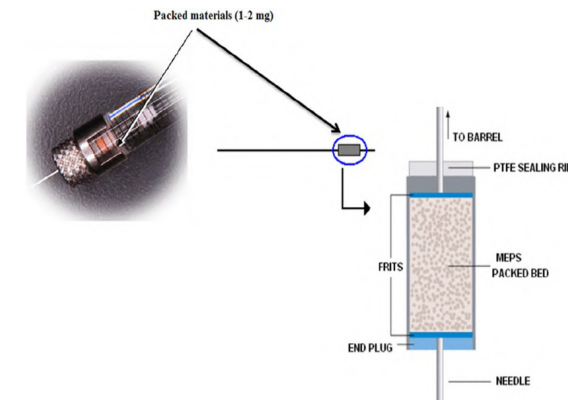
H-ESI source operating condition:

- Spray Voltage 3.30 kV
- Capillary temperature 320 ° C
- H-ESI temperature 320 ° C
- Sheat gas (Azoto) 55 unità
- Auxiliary gas 20 unità

Drugs' extraction  
from Oral Fluid

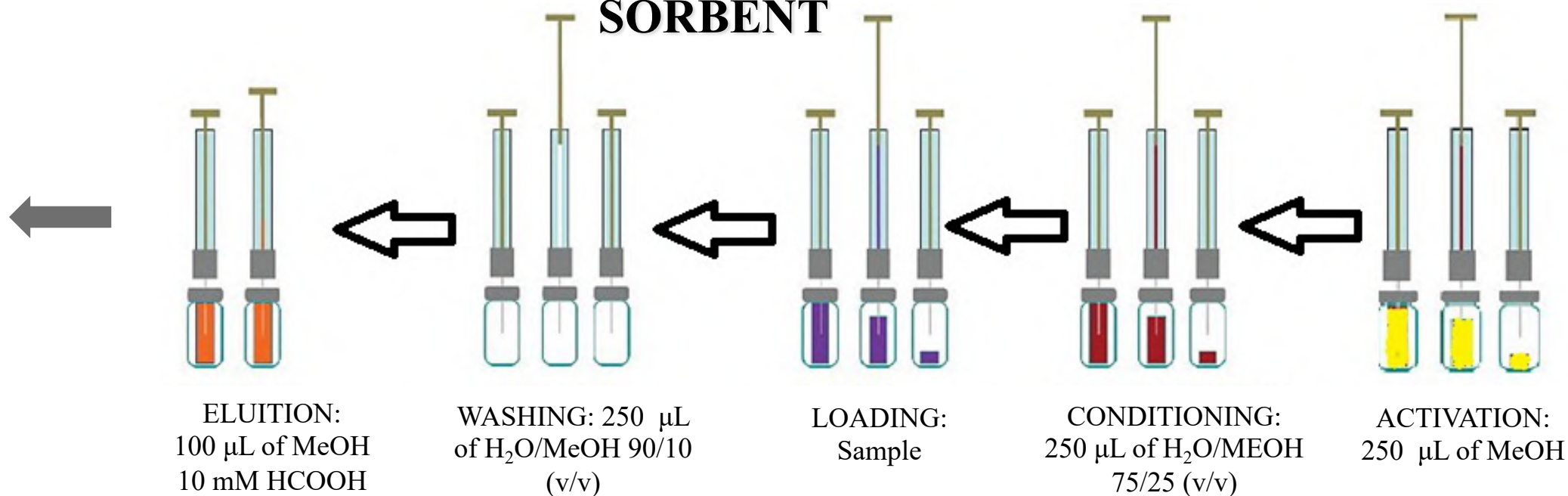
**MEPS**

- ✓ 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



ELUTION:  
100  $\mu\text{L}$  of MeOH  
10 mM HCOOH

WASHING: 250  $\mu\text{L}$   
of  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  90/10  
(v/v)

LOADING:  
Sample

CONDITIONING:  
250  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$   
75/25 (v/v)

ACTIVATION:  
250  $\mu\text{L}$  of MeOH



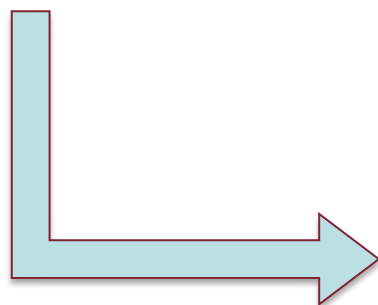
## Oral Fluid analysis



- 90  $\mu\text{L}$  of OF mixed with 60  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 50  $\mu\text{L}$  of MeOH with ISs
- Sonication (6')
- Centrifugation for 5' at  $10,000 \times g$

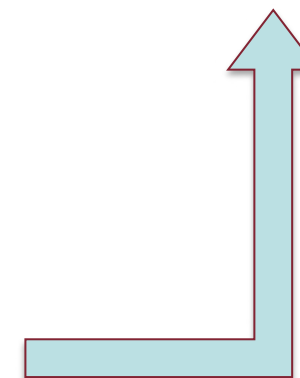


*Chromatography:* Micro-Lc Pump Perkin-Elmer serie 200;  
Col. Brownlee SPP packed with core-shell particles (2.7  $\mu\text{m}$ ,  
2.1 x 150 mm); mobile phases: MeOH:AcN (80:20, v:v)  
5mM HCOOH (A) and water 5 mM HCOOH (B);  
*Mass Spec:* API 2000 AB-Sciex  
ESI+, turboionspray, MRM  
Total time 15 min



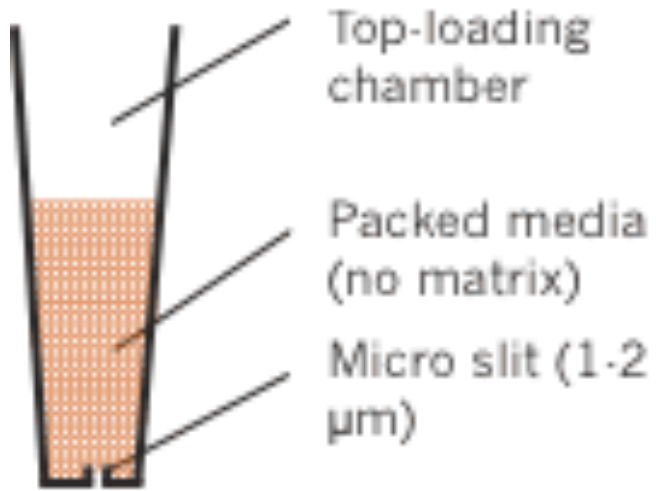
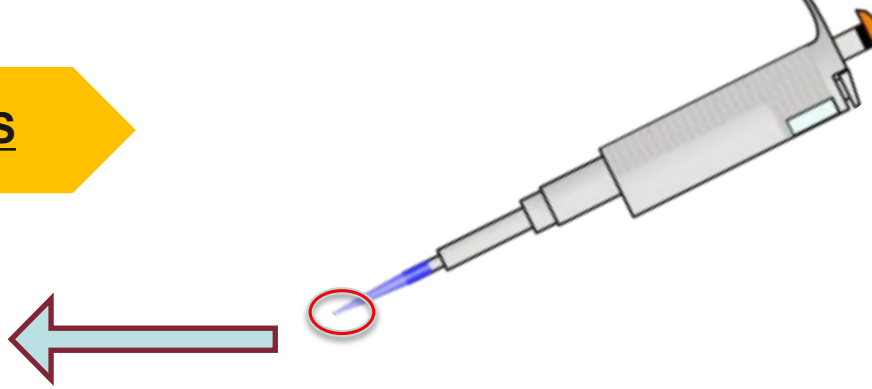
- ❖ BIN activation
- ❖ Conditioning
- ❖ Loading
- ❖ Washing
- ❖ Elution
- ❖ Injection

250  $\mu\text{l}$  MeOH x 3 cycles  
250  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ :MeOH 90:10 x 2 cycles  
5 aspire/dispense cycles  
100  $\mu\text{l}$  of  $\text{H}_2\text{O}$ :MeOH (90:10)  
100  $\mu\text{l}$  MeOH/HCOOH 10mM  
6  $\mu\text{l}$  in LC-MS/MS system.



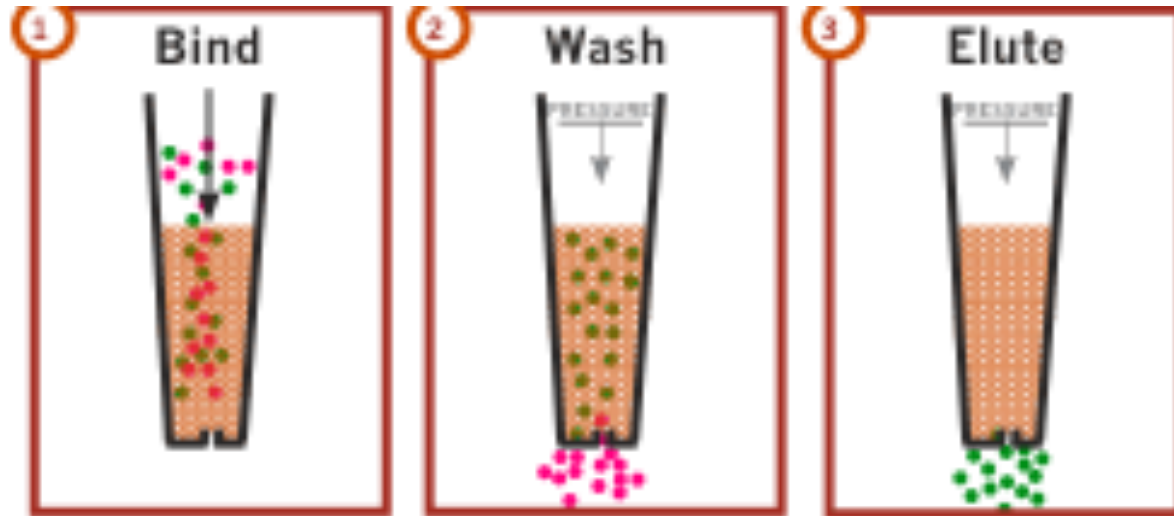
Drugs' extraction  
from Urine

**MEPS**



**Conditioning**

100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O:MeOH (90:10)



100  $\mu$ L urine + IS

100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

100  $\mu$ l MeOH  
HCOOH 10mM

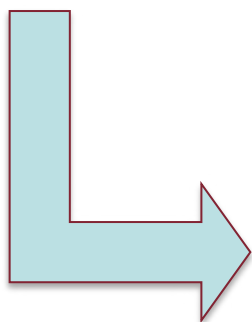
**HYDROLYSIS**

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

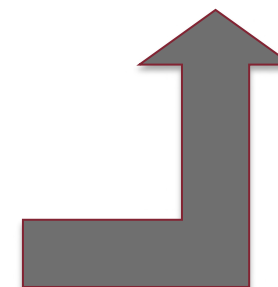


*Chromatography:* Micro-Lc Pump Perkin-Elmer serie 200; Col. Brownlee SPP packed with core-shell particles (2.7  $\mu$ m, 2.1 x 150 mm); mobile phases: MeOH:can 5mM HCOOH (A) and water 5 mM HCOOH (B);

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

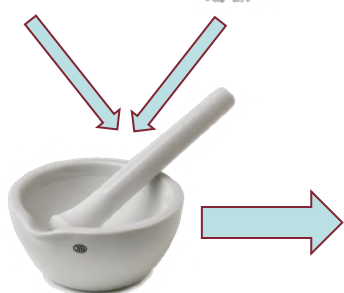


**CLEAN-UP  
SPE**



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



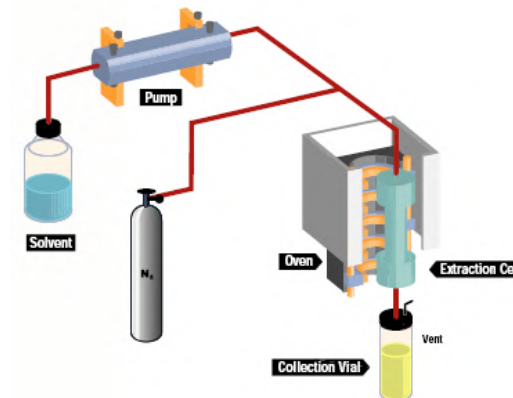
9000 rpm  
5 min

5 mL



**Clean-up**

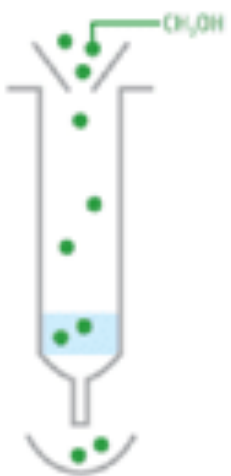
UHPLC-HRMS/MS



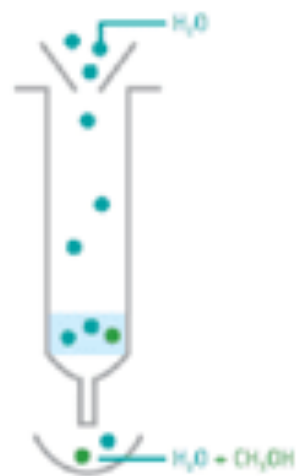
- Rapid extraction from sample with high temperature and pressure solvents
- Features:
  - ✓Reduced use of organic solvents: water is the main extractant solvent (PHWE)
  - ✓Different classes in one process
  - ✓Automated process- reproducibility
  - ✓Reduced analysis time

# Clean- up SPE

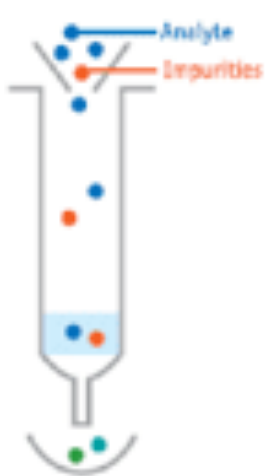
- Time reduction
- Improve selectivity
- Miniaturization, reduction of sample volume
- New trends: MISPE, SPME, MEPS, monolith spin extraction



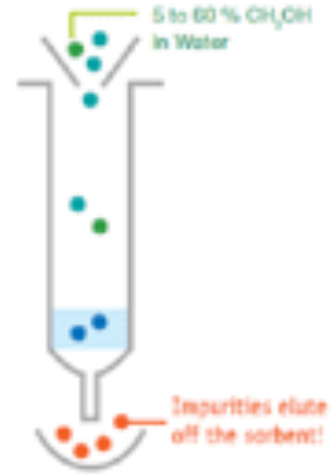
ACTIVATION:  
1 mL of MeOH



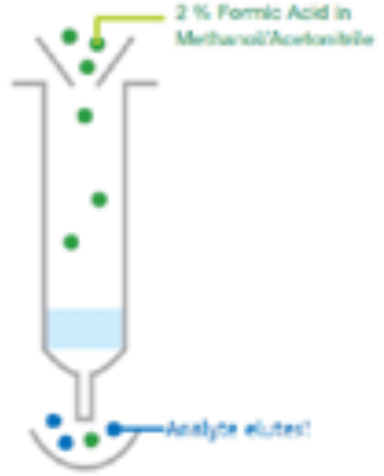
CONDITIONING:  
1 mL of  
H<sub>2</sub>O/MEOH 80/20  
(v/v)



LOADING:  
Sample



WASHING: 1  
mL of H<sub>2</sub>O



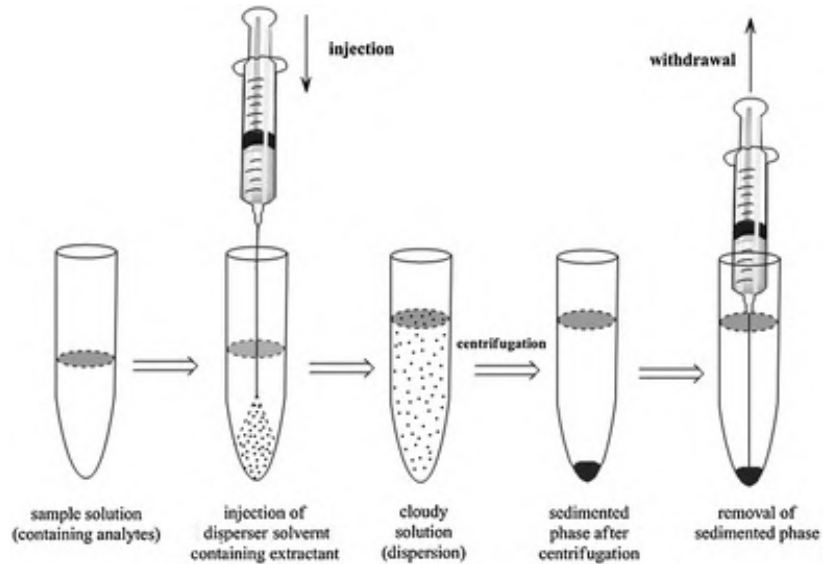
ELUTION:  
500 µL of  
MeOH 10  
mM HCOOH



UHPLC-HRMS/MS



## Clean-up dLLME



- 5000  $\mu\text{L}$  from the ASE extract
- 20  $\mu\text{L}$  NaOH 1M
- 5000  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O milliQ
- 500  $\mu\text{L}$  buffer (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)/(CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) pH 11
- 1,2 g NaCl
- ➔ 500  $\mu\text{L}$  2-Propanol + 200  $\mu\text{L}$  CHCl<sub>3</sub>

Evaporate and reconstitute with 200  $\mu\text{L}$  of MeOH/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v)



UHPLC-HRMS/MS

## Miniaturized Liquid-Liquid Extraction Technique

Exploits a ternary mixture of solvents

- Water Solvent
- Extraction Solvent
- Disperser Solvent

Rapid injection of a mixture of disperser solvent and extraction solvent

↓  
*Cloudy solution* is formed

↓  
Centrifugation and sedimentation

↓  
Store the organic phase containing the target analites



## ...Nuove Sostanze Psicoattive



## New psychoactive substances

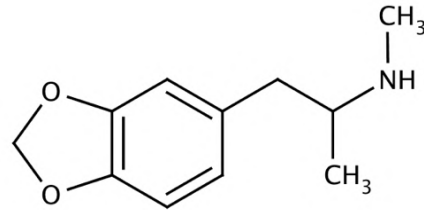
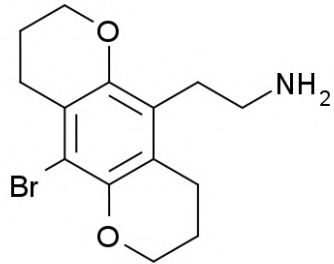
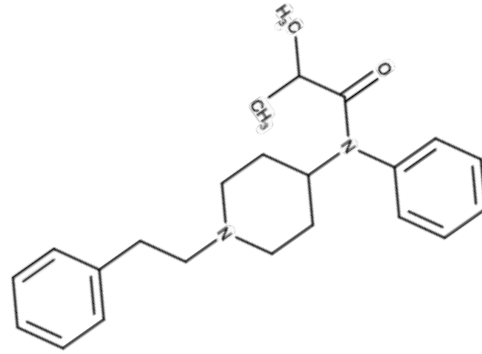


Younger adults  
(15-24)

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**



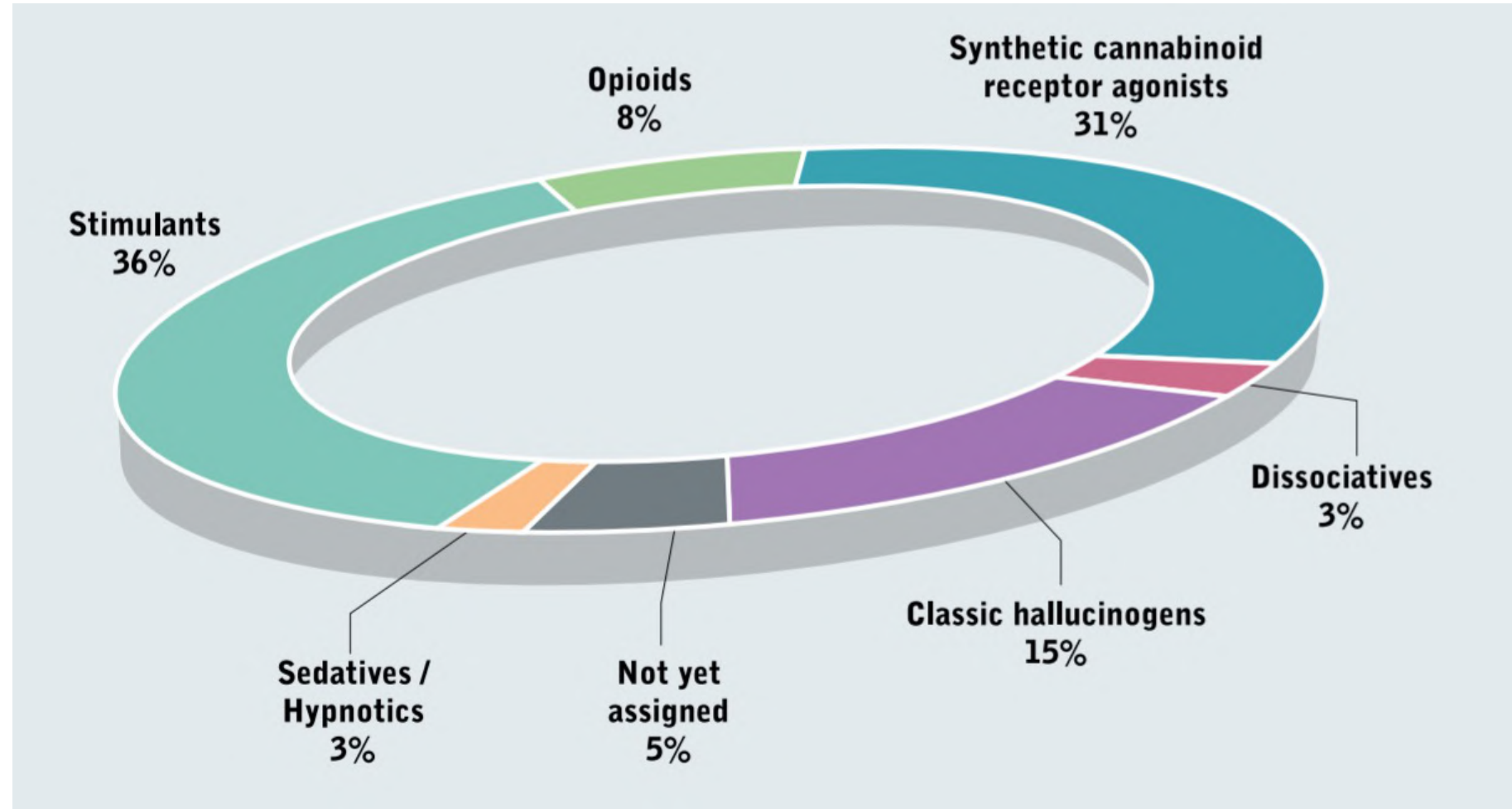
**DPR 309/90**



**Early warning system (EWS)**

Approccio generico: attenzionare gli analoghi e i precursori

950 NPS sono state riportate fino a Dicembre al sistema EWS



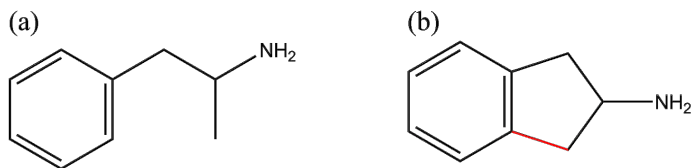
Classification fornita da United Nations Office on Drugs and Crime - UNODC





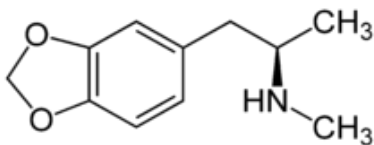
Classification fornita da United Nations Office on Drugs and Crime - UNODC





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

The aminoindanes were reported to possess significant bronchodilating and analgesic properties. Potent effects on the release and re-uptake of serotonin were also observed. As a result of the latter these substances have been sold as NPS for their ability to produce empathogenic and entactogenic effects of serotonin releasing drugs, such as MDMA.

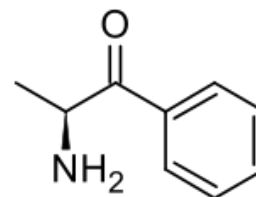
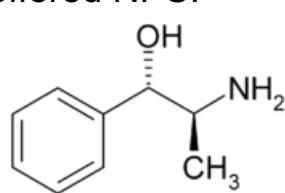


Katrom

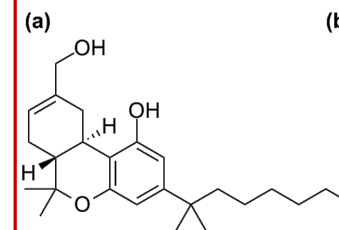


Kath

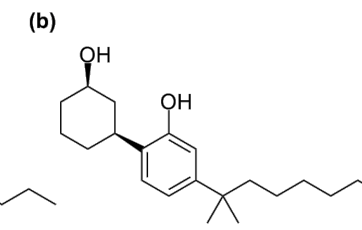
Internet surveys conducted by the EMCDDA in 2008 and 2011 revealed that kratom is one of the most widely offered NPS.



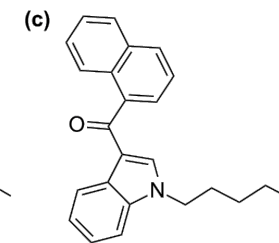
Since 2004, the composition of 'herbal highs' products seems to have substantially changed and now include potent new psychoactive compounds known as synthetic cannabinoids.



(a) HU-210;



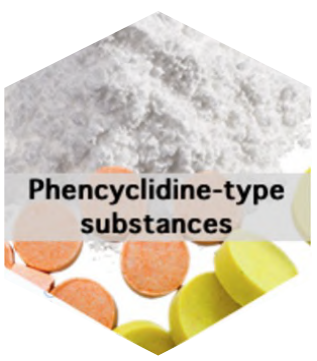
(b) CP-47,497;



(c) JWH-018

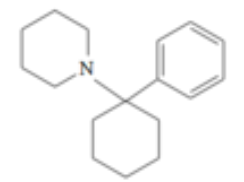
While cannabis and THC are controlled under the international drug control treaties, none of the synthetic cannabinoids are currently under international control. However, several have been subject to control measures at the national level.

# NPS - Classification

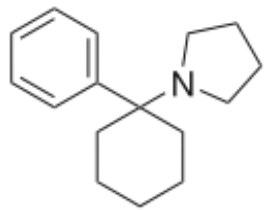


Phencyclidine-type substances

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



PCP

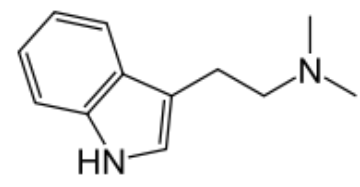


PHP

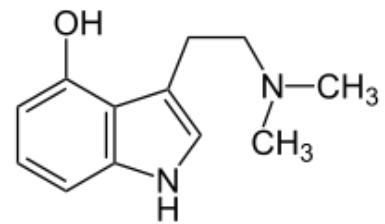


Tryptamines

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



DMT

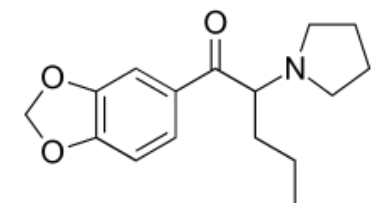


Psilocin

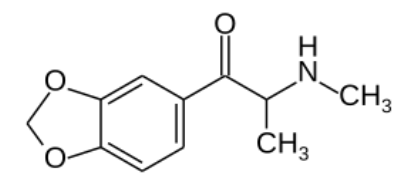


Synthetic cathinones

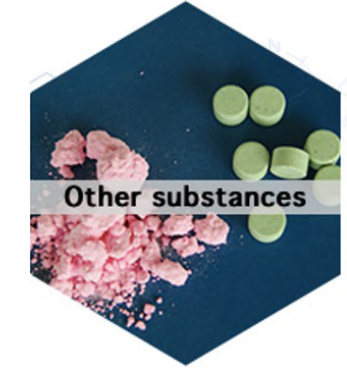
Synthetic cathinones are  $\beta$ -keto phenethylamines and chemically similar to amphetamine and methamphetamine.



MDPV



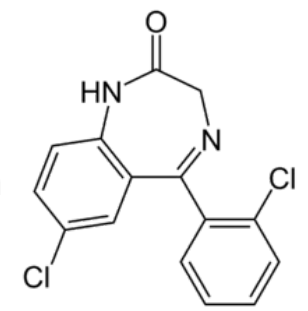
Methylone



Other substances

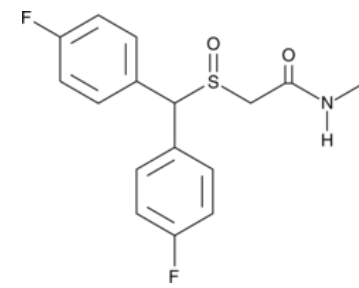
## Sedatives / Hypnotics:

Delorazepam

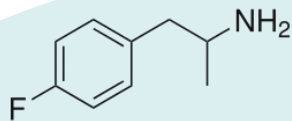
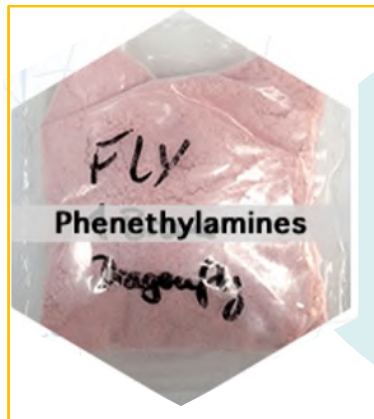


## Stimulants

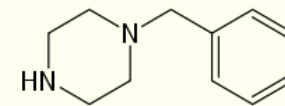
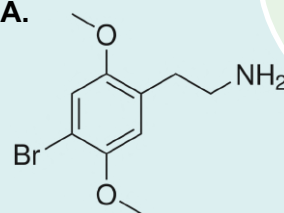
Modafinil



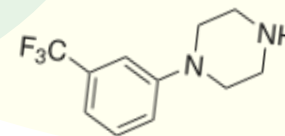
# Fenetilammine Piperazine e Opioidi sintetici



Phenethylamines refer to a class of substances with documented psychoactive and stimulant effects and include amphetamine, methamphetamine and MDMA.

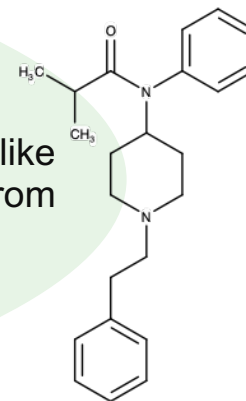
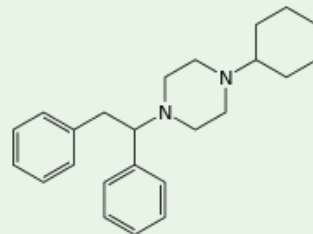


Piperazines have been described as 'failed pharmaceuticals', as some had been evaluated as potential therapeutic agents by pharmaceutical companies but never brought to the market. Most piperazines act as central nervous system stimulants. In some cases, they can also act as opioids.



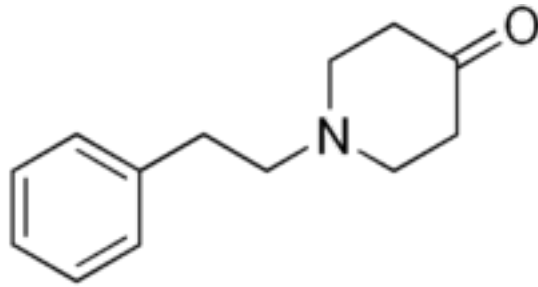
## Synthetic Opioids

Synthetic opioids refer to a category of novel psychoactive substances (NPS) that are either known to be opiates or have opiate-like effects. These are not naturally occurring substances, although they have effects related to the naturally occurring drugs from several species of the opium poppy plant.

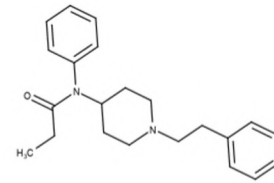


# FENTANYL e I suoi derivati

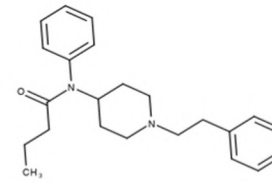
Precursore



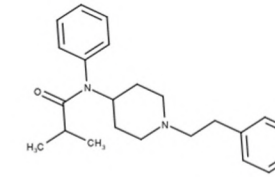
N-Phenethyl-4-piperidinone  
(4-ANPP)



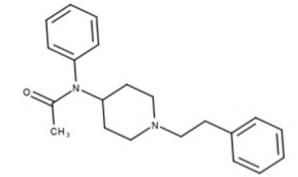
Fentanyl



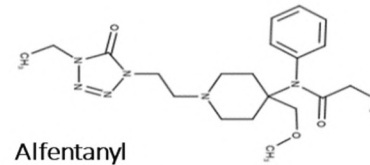
Butyrfentanyl



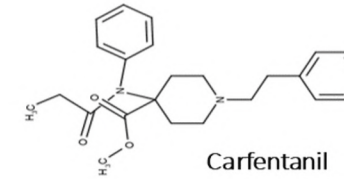
Isobutyrylfentanyl



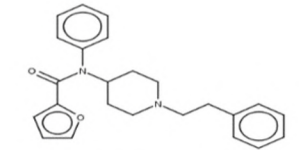
Acetylfentanyl



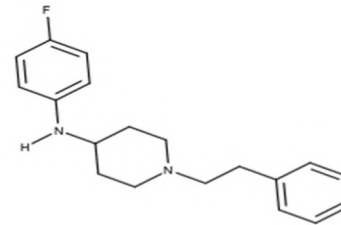
Alfentanyl



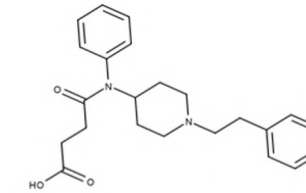
Carfentanil



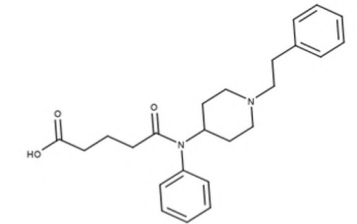
Furanylfentanyl



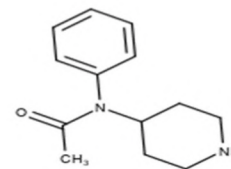
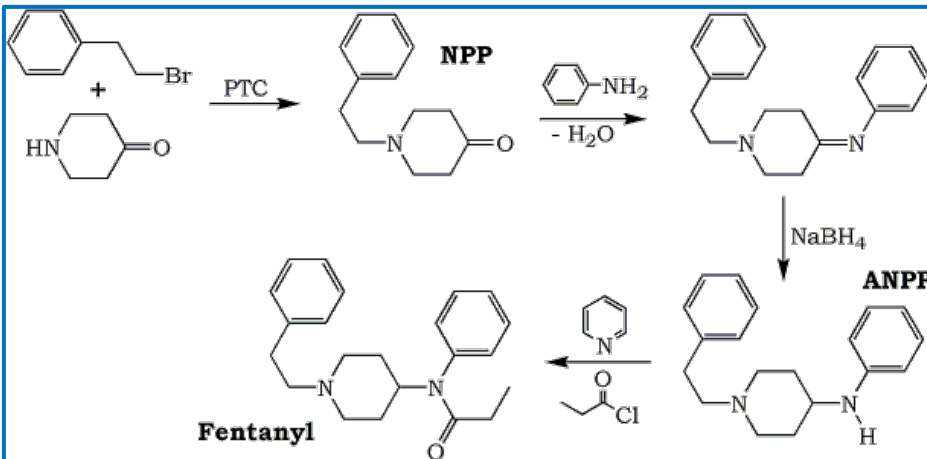
Despropionyl para-Fluorofentanyl



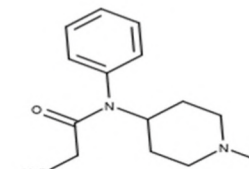
Butyryl fentanyl carboxy metabolite



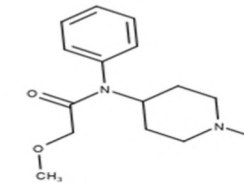
Valeryl fentanyl carboxy metabolite



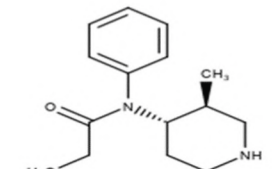
Acetyl norfentanyl



Norfentanyl



Methoxyacetyl norfentanyl



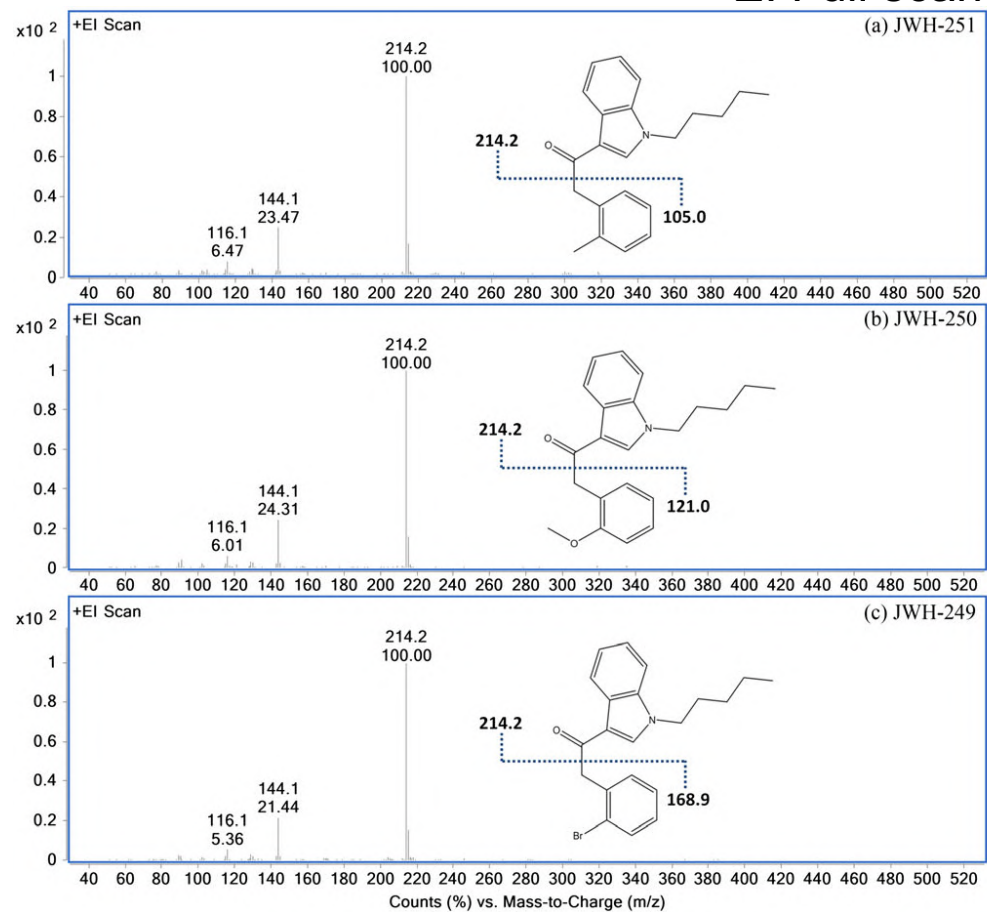
(±)-trans-3-methyl Norfentanyl



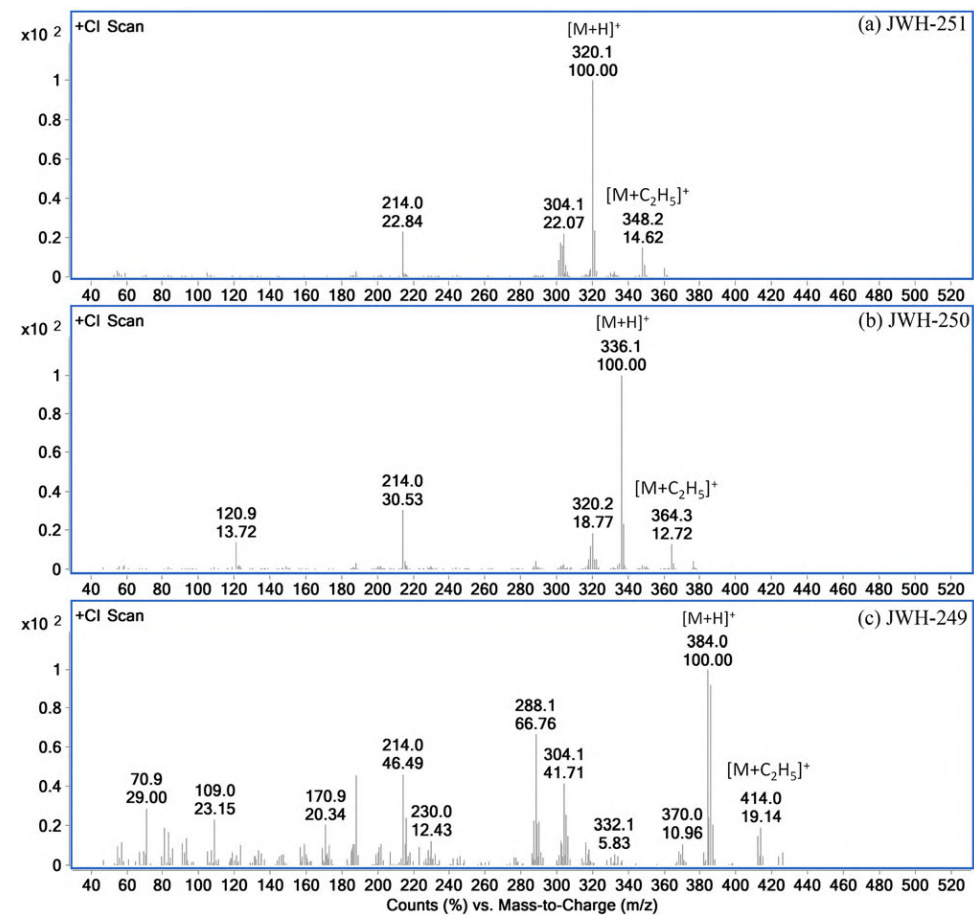
## Qualitative analysis of seized synthetic cannabinoids and synthetic cathinones by gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry

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

### EI Full scan



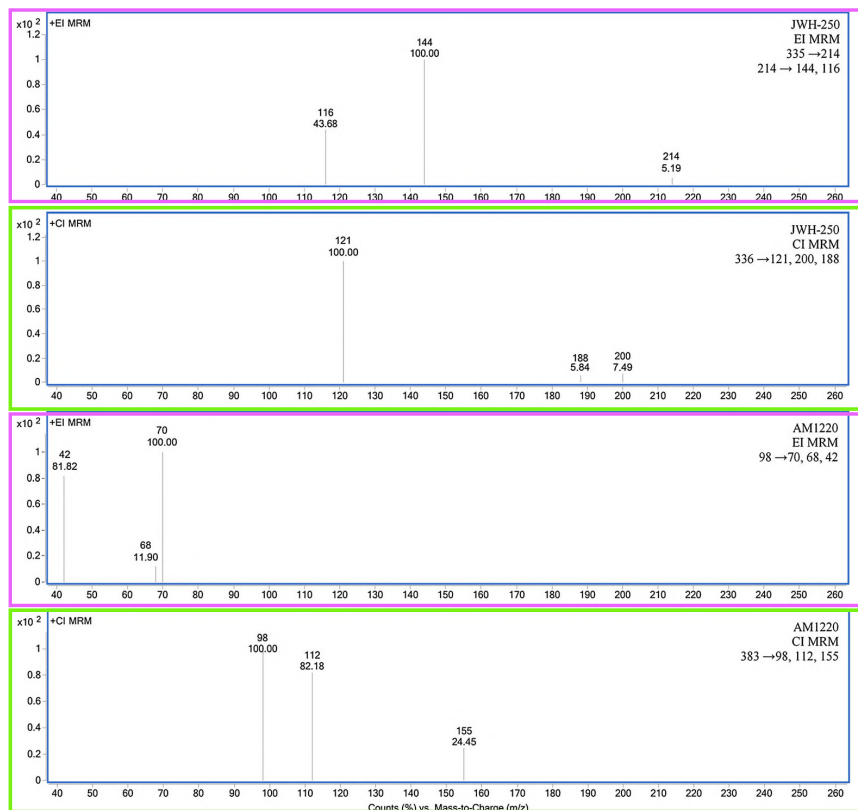
### CI Full scan



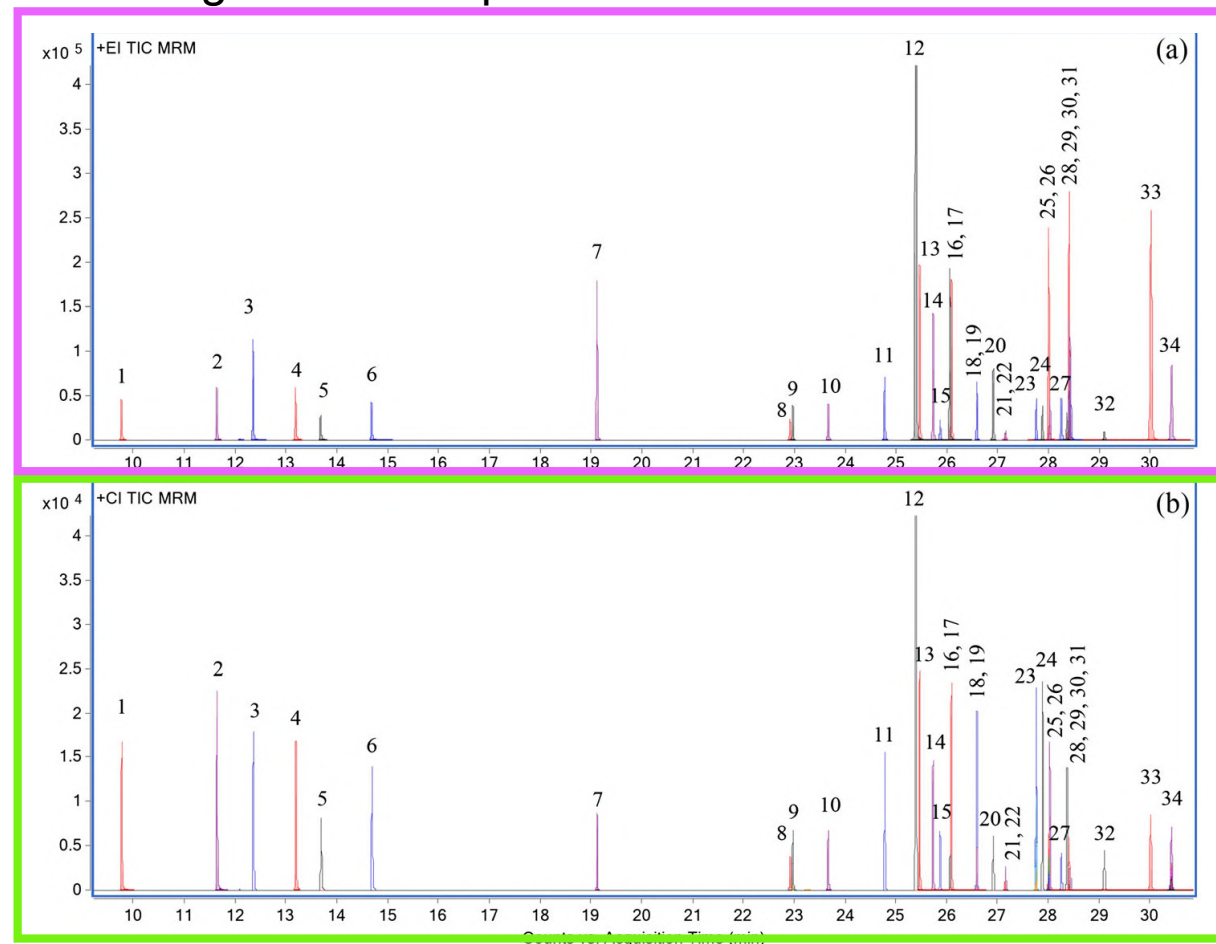


## Qualitative analysis of seized synthetic cannabinoids and synthetic cathinones by gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry

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



## Cromatogramma completo di 50 NPS



Differenze di frammentazioni partendo da sorgente **EI** o **CI**

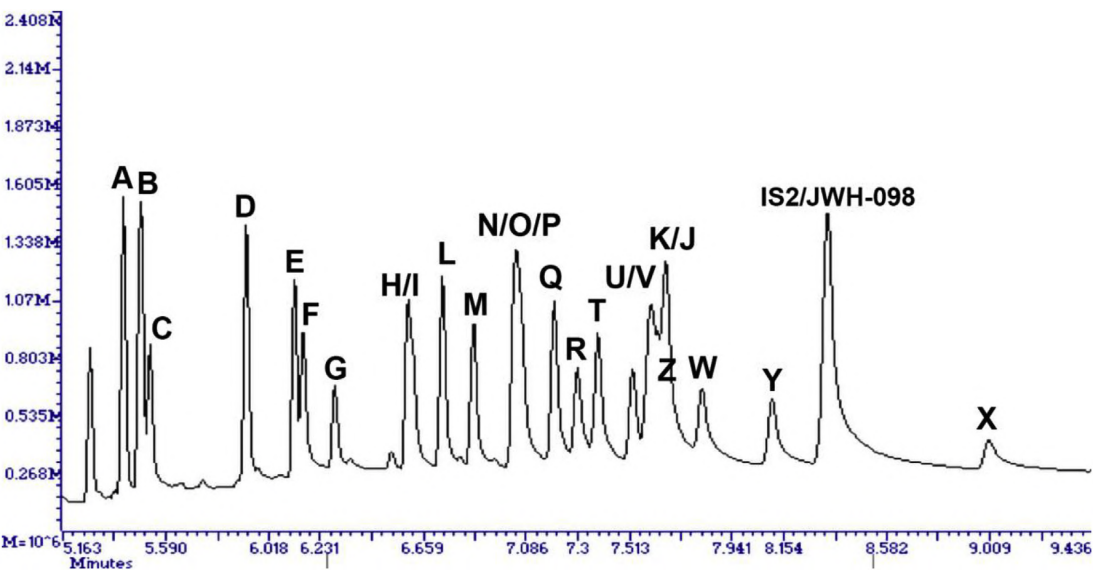


Screening of new psychoactive substances (NPS) by gas-chromatography/time of flight mass spectrometry (GC/MS-TOF) and application to 63 cases of judicial seizure



Michele Dei Cas, Eleonora Casagni, Sebastiano Arnoldi, Veniero Gambaro, Gabriella Roda\*

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università Degli Studi di Milano, Via Mangiagalli 25, 20133, Milano, Italy



# GC-MS - Applicazioni

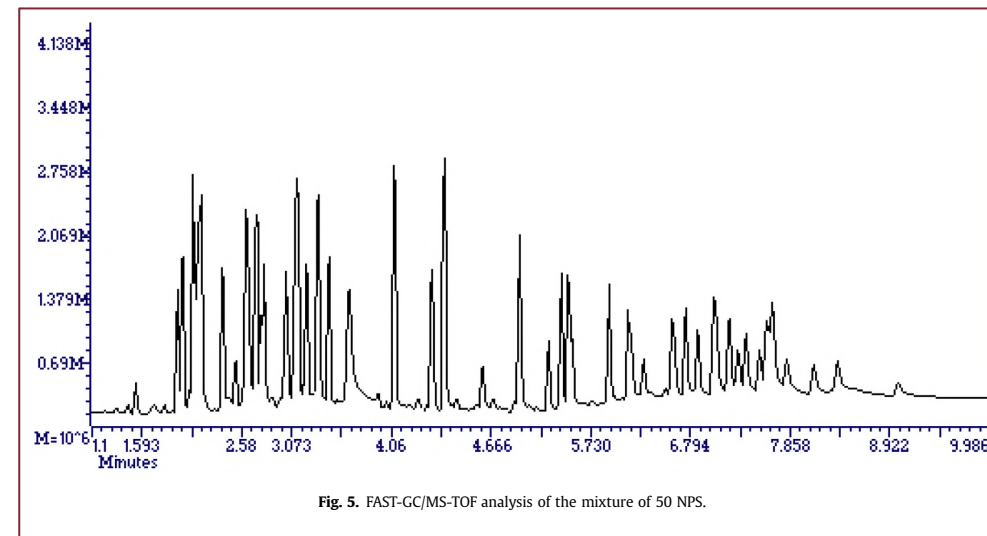
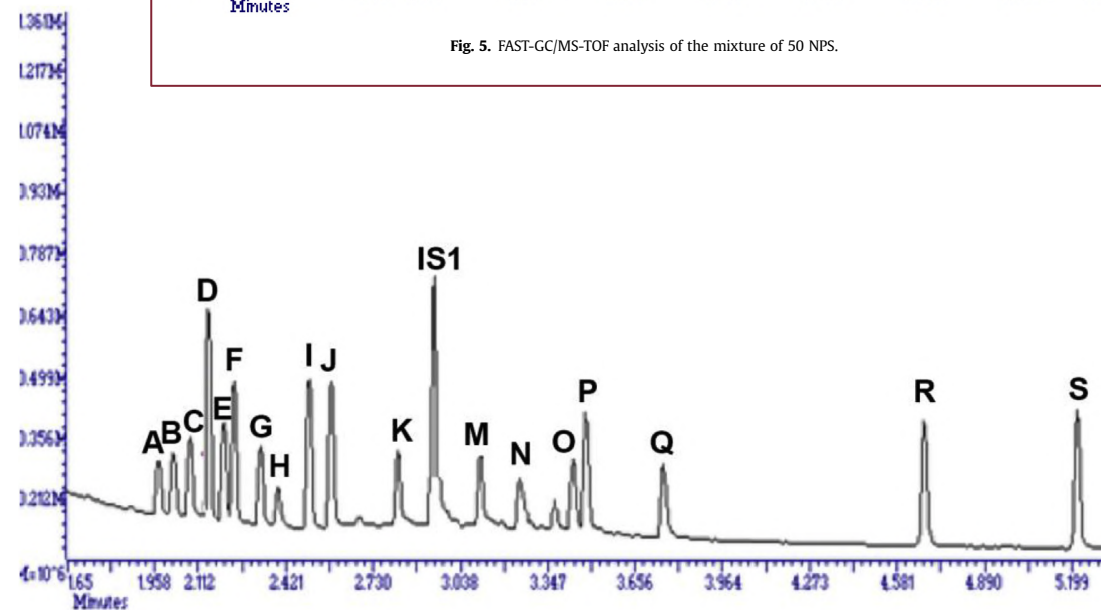
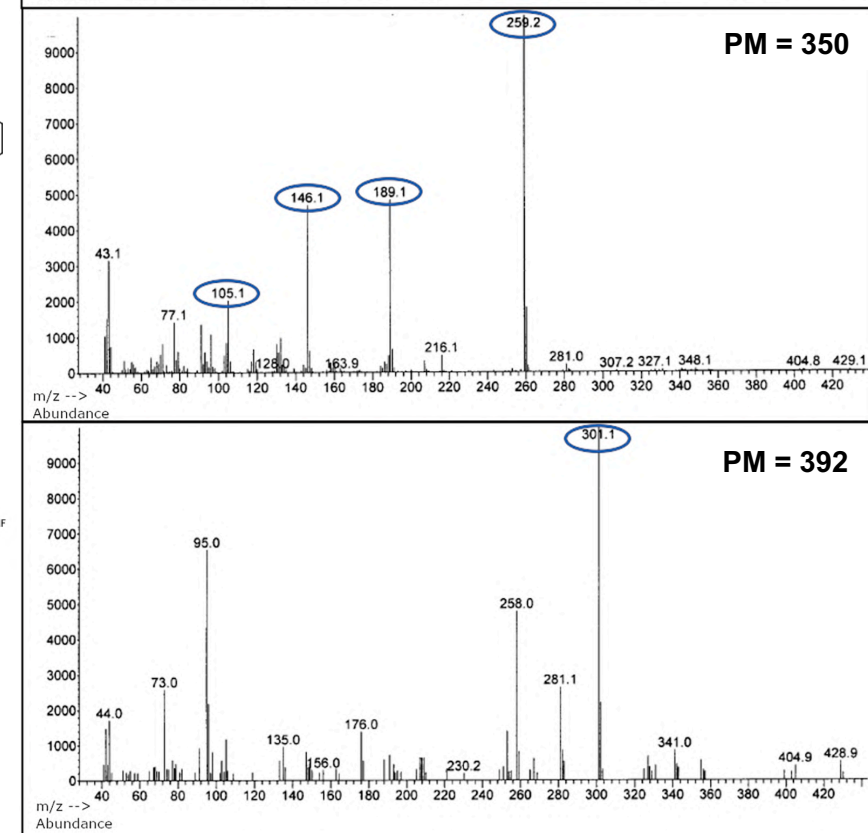
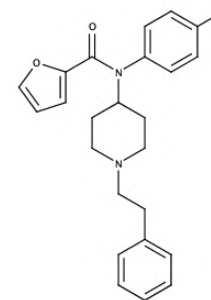
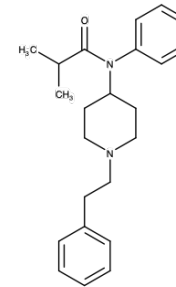
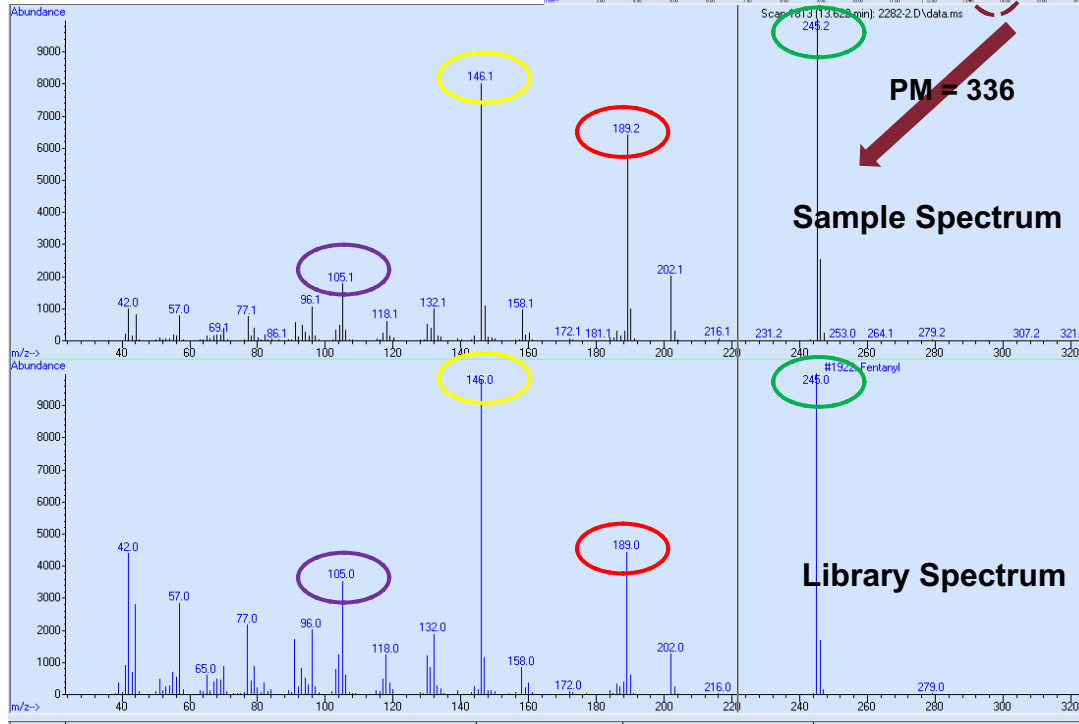
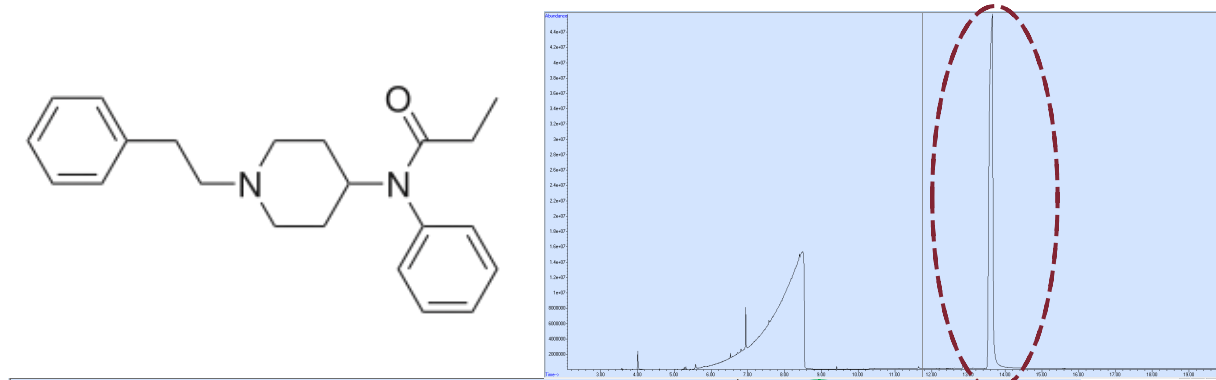


Fig. 5. FAST-GC/MS-TOF analysis of the mixture of 50 NPS.

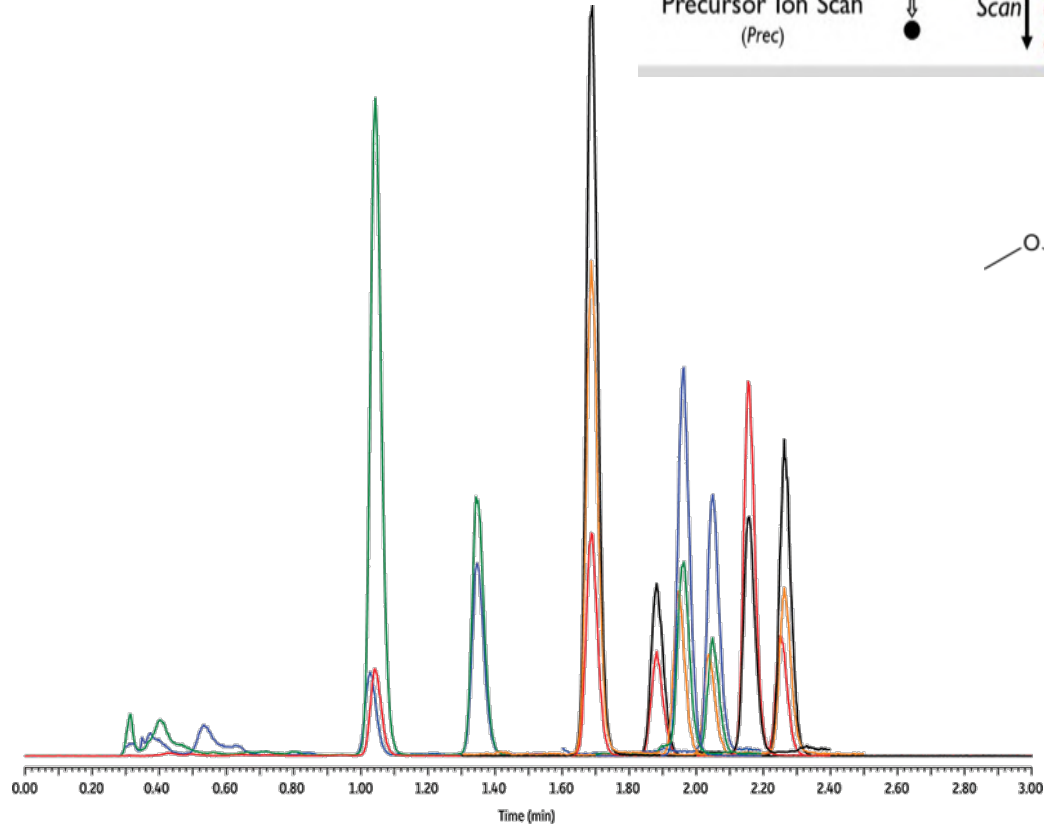
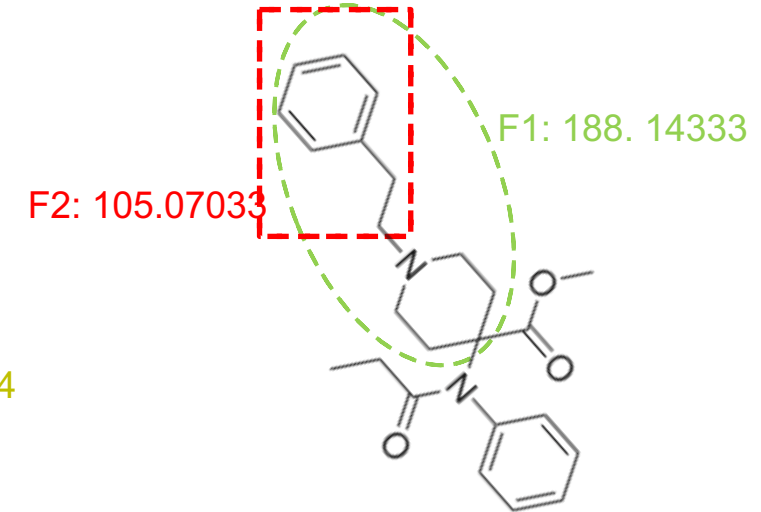
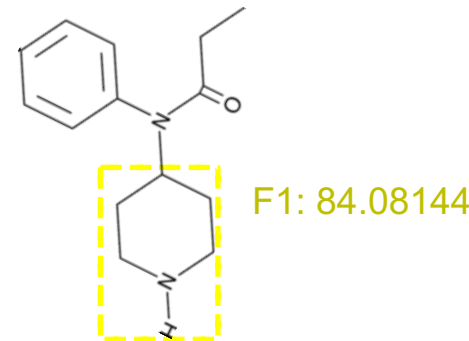
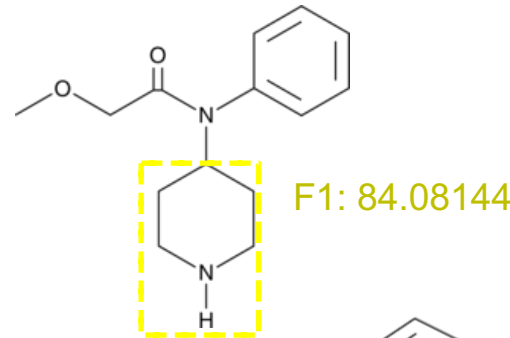
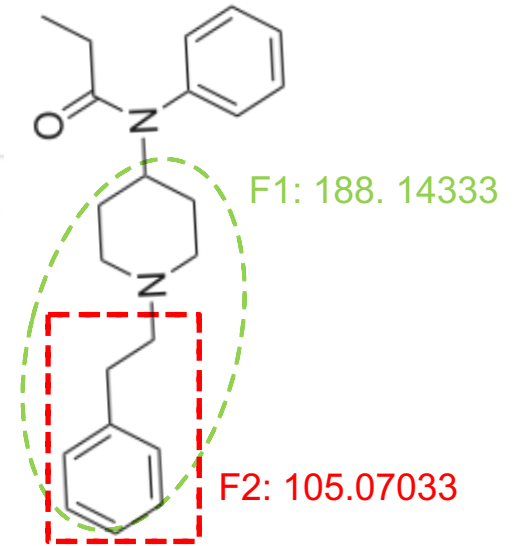
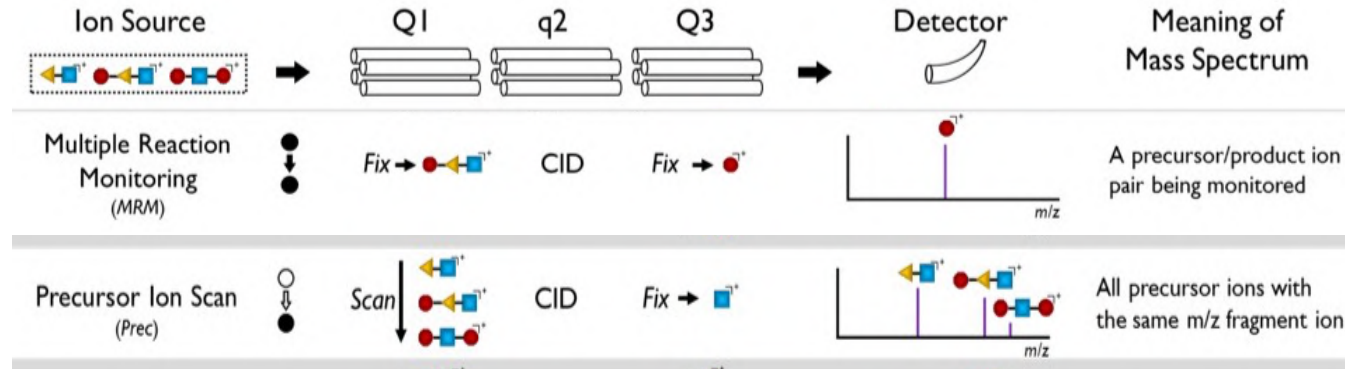


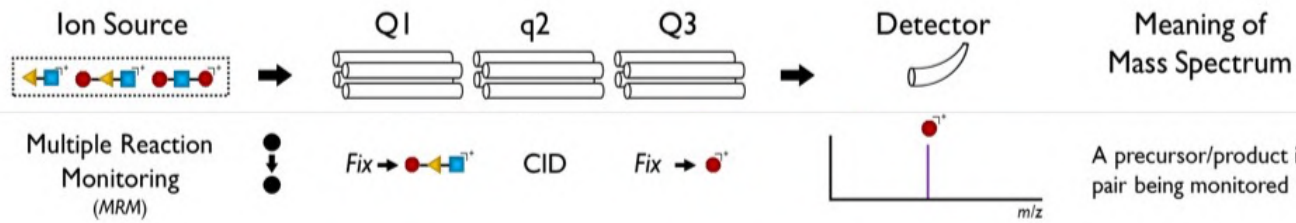
# GC-MS - Applicazioni



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

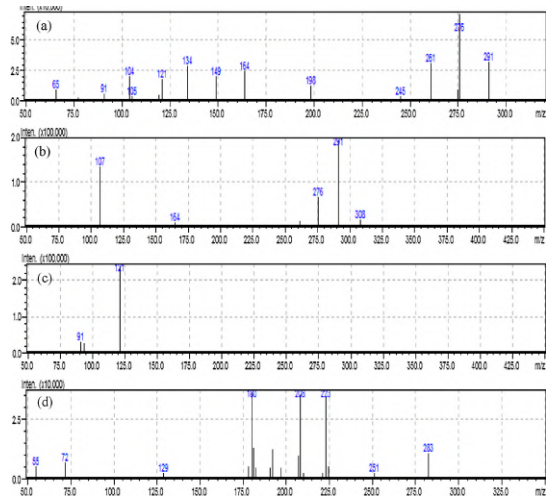
Forensic Science International 301 (2019) 394–401



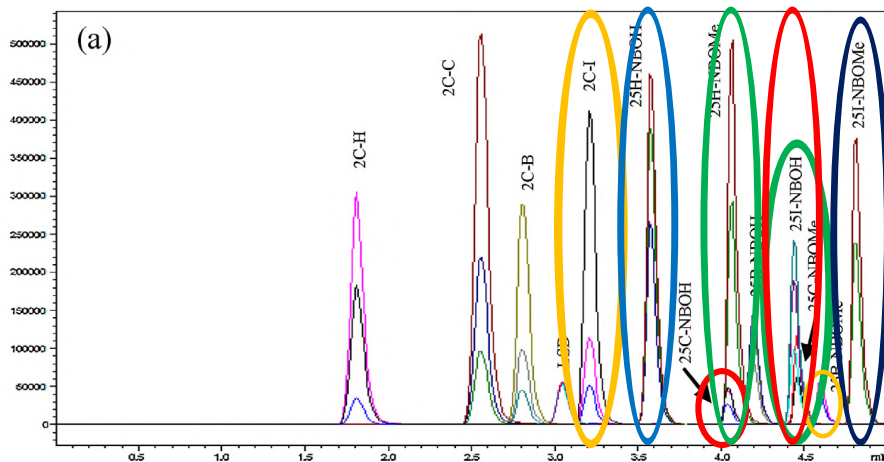
Simultaneous analysis of 2Cs, 25-NBOHs, 25-NBOMes and LSD in seized exhibits using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A targeted approach

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>

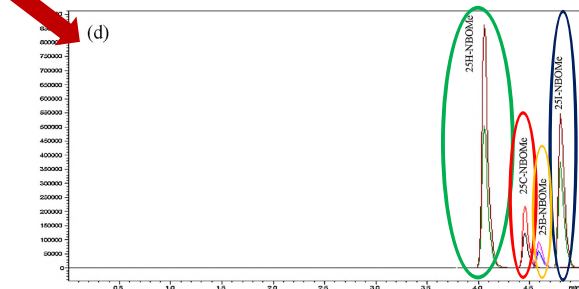
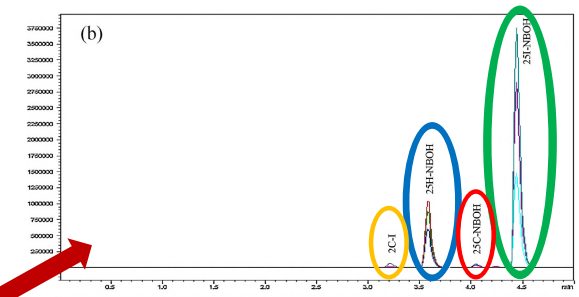
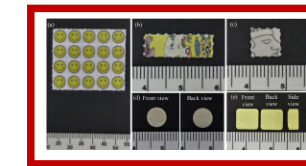
<sup>a</sup> illicit Drugs Laboratory, Health Sciences Authority, 11 Outram Road, Singapore 169078, Singapore  
<sup>b</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, National University of Singapore, 6 Science Drive 2, Singapore 117546, Singapore



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



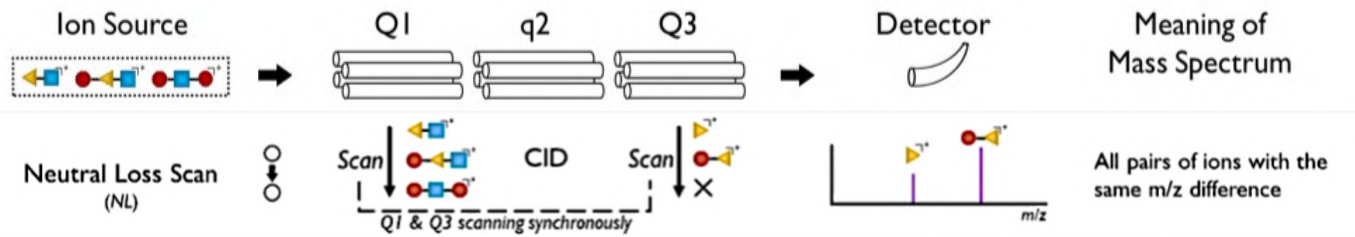
2. Messa a punto di un efficiente metodo cromatografico



## 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

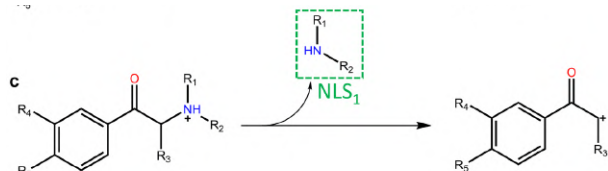
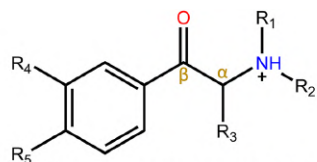


## Rapid tentative identification of synthetic cathinones in seized products taking advantage of the full capabilities of triple quadrupole analyzer

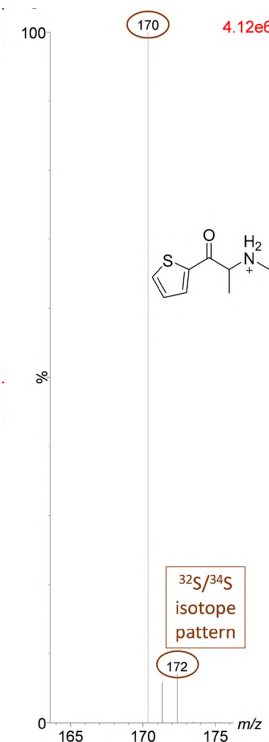
David Fabregat-Safont<sup>1</sup> · Juan V. Sancho<sup>1</sup> · Félix Hernández<sup>1</sup> · María Ibáñez<sup>1</sup>

## Catinoni Sintetici

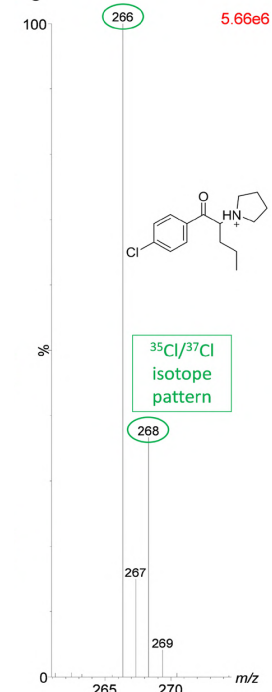
- $R_1$ : H, methyl (if  $R_2$  is methyl)
- $R_2$ : H, methyl, ethyl, isopropyl
- $R_1+R_2$ : pyrrolidine
- $R_3$ :  $C_nH_{2n+2}$  ( $n=1-4$ )
- $R_4$ : H, halogen atom (if  $R_5$  is H), methyl (if  $R_5$  is H or methyl), ethyl (if  $R_5$  is H), methoxy (if  $R_5$  is H or methoxy)
- $R_5$ : H,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



Alkyl chain length	Amine functionalization				
	$H_2N$	$HN$	$H_2N$	$H_2N$	$HN$
	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
	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

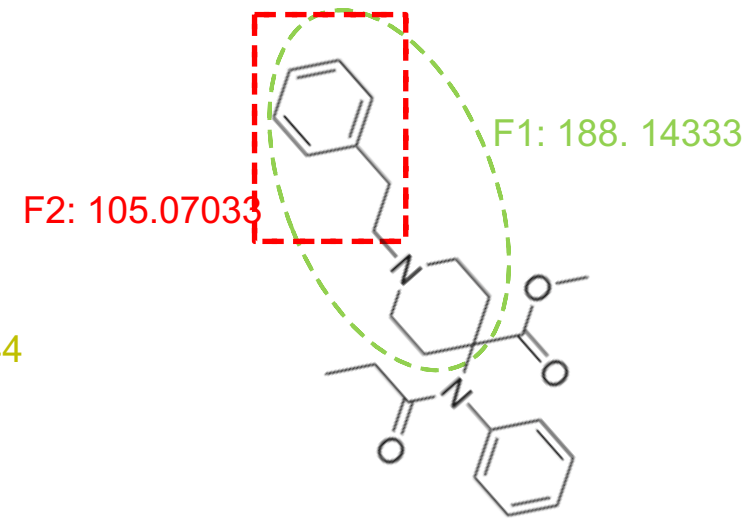
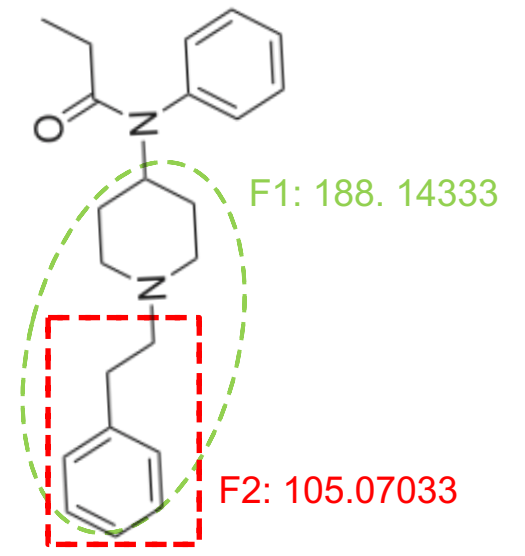
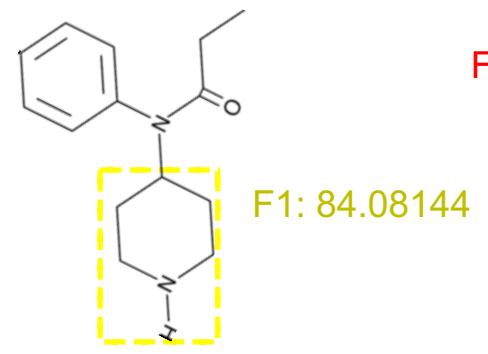
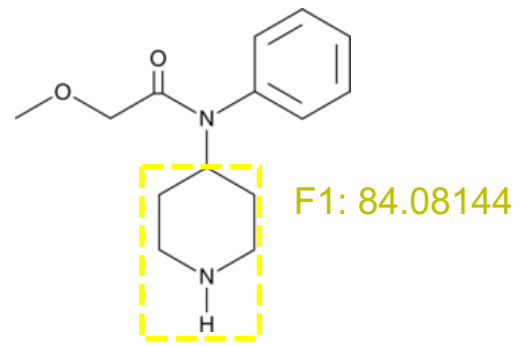
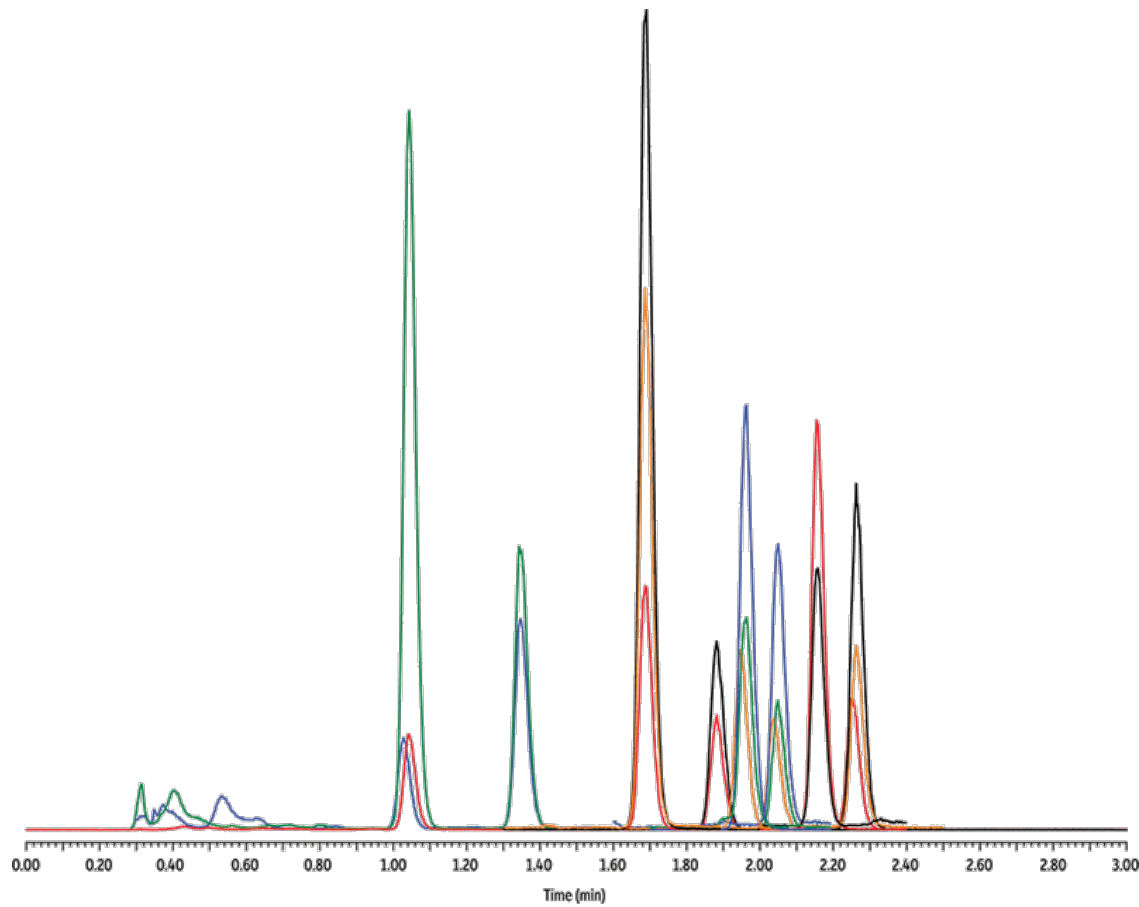
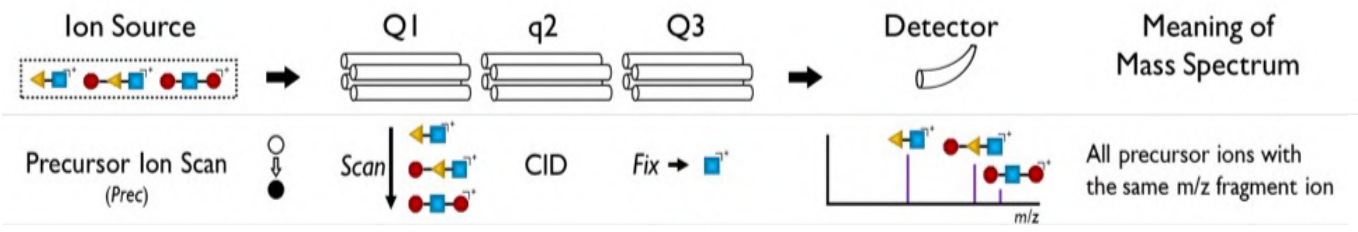


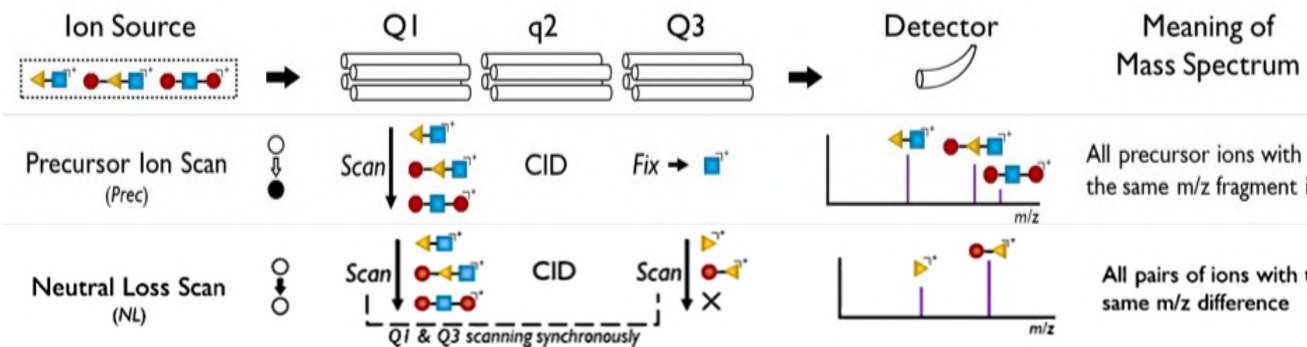
Perdita Neutra = 59 Da



Perdita Neutra = 70 Da

# HPLC-MS/MS - Applicazioni





# HPLC-MS/MS - Applicazioni

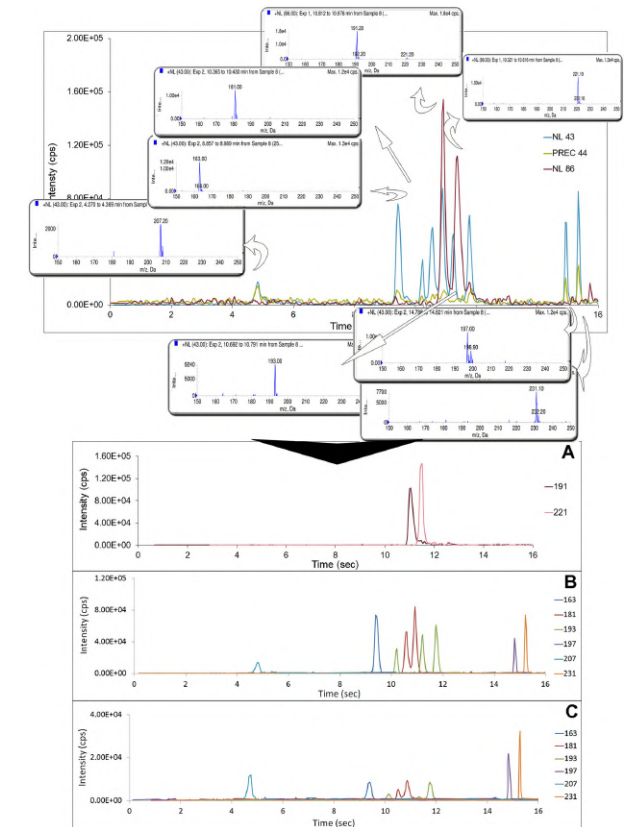
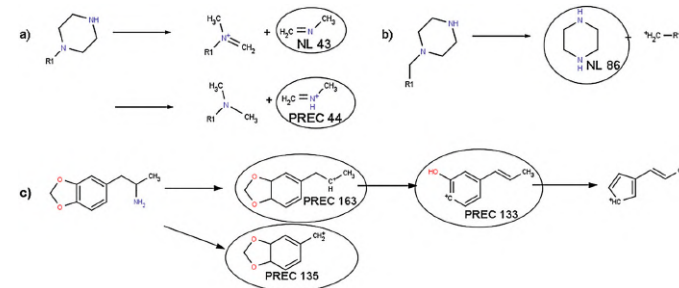
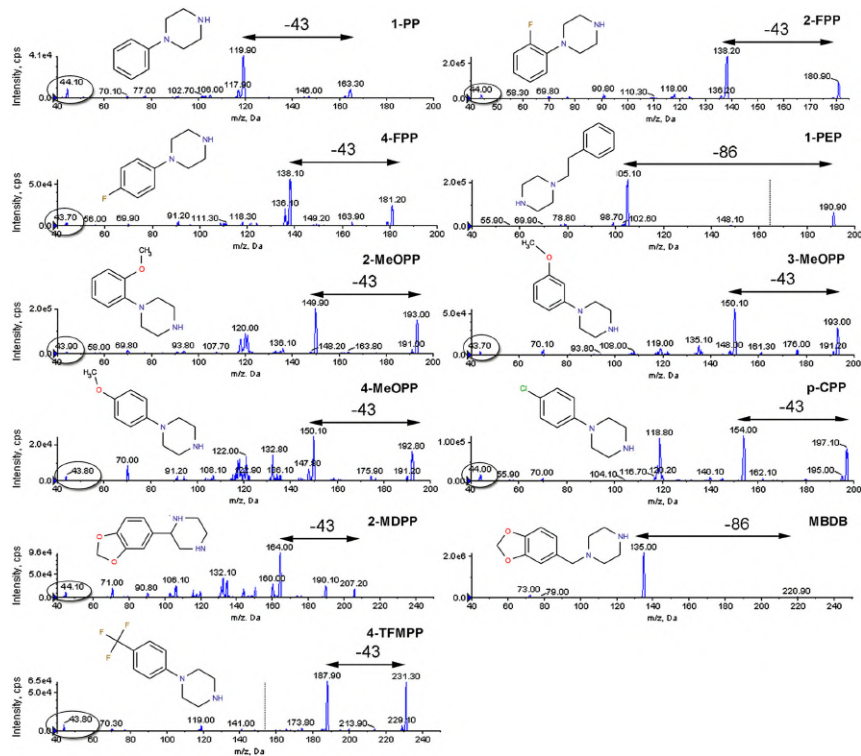
Research article

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

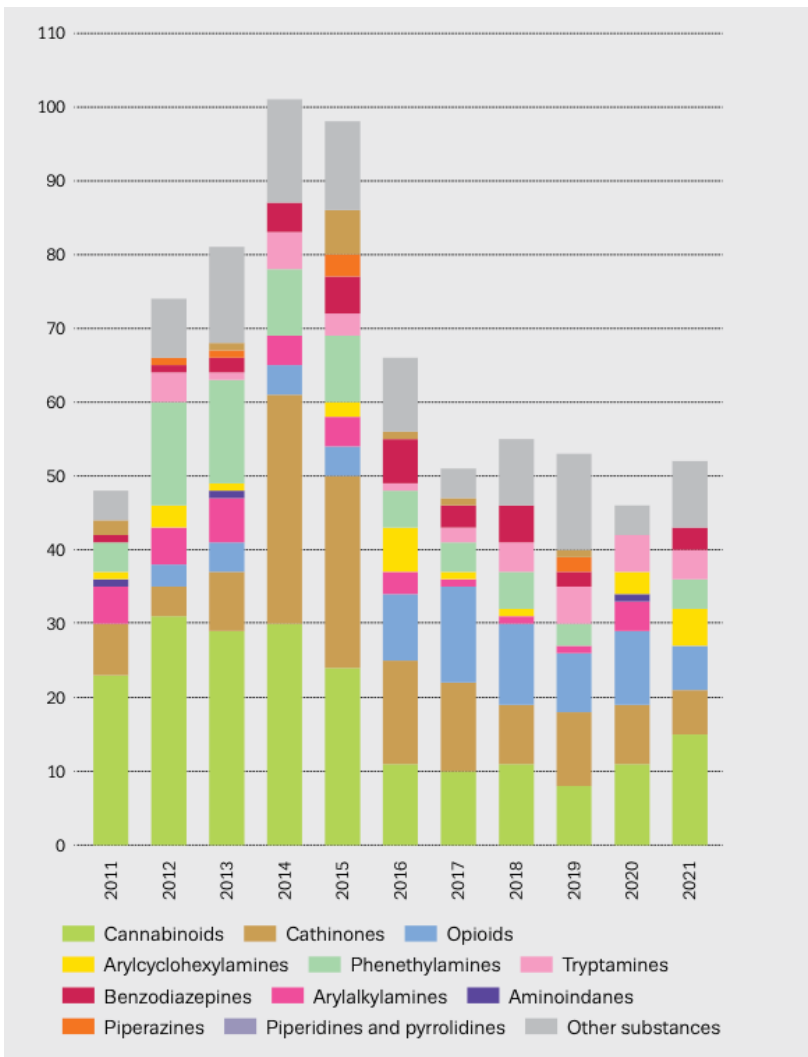
## Screening of methylenedioxyamphetamine- and piperazine-derived designer drugs in urine by LC-MS/MS using neutral loss and precursor ion scan

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

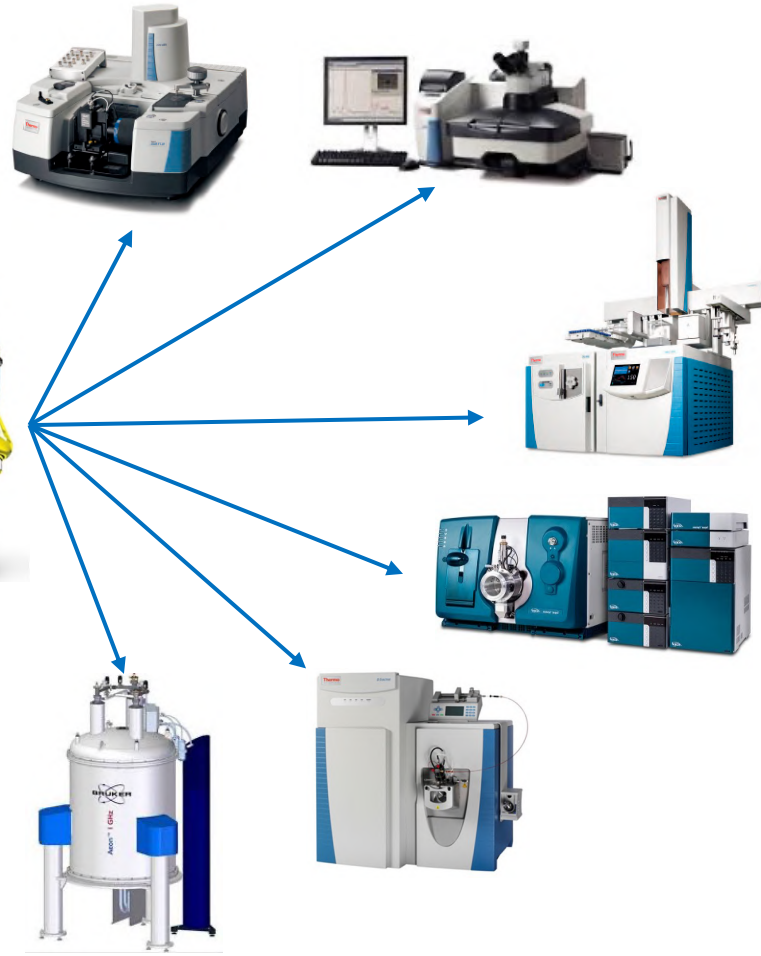


Esempio di pericolosità dei nuovi oppioidi sintetici. In immagine sono riportate le dosi con uguale effetto sul SNC

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



# Infrared spectroscopy - IR



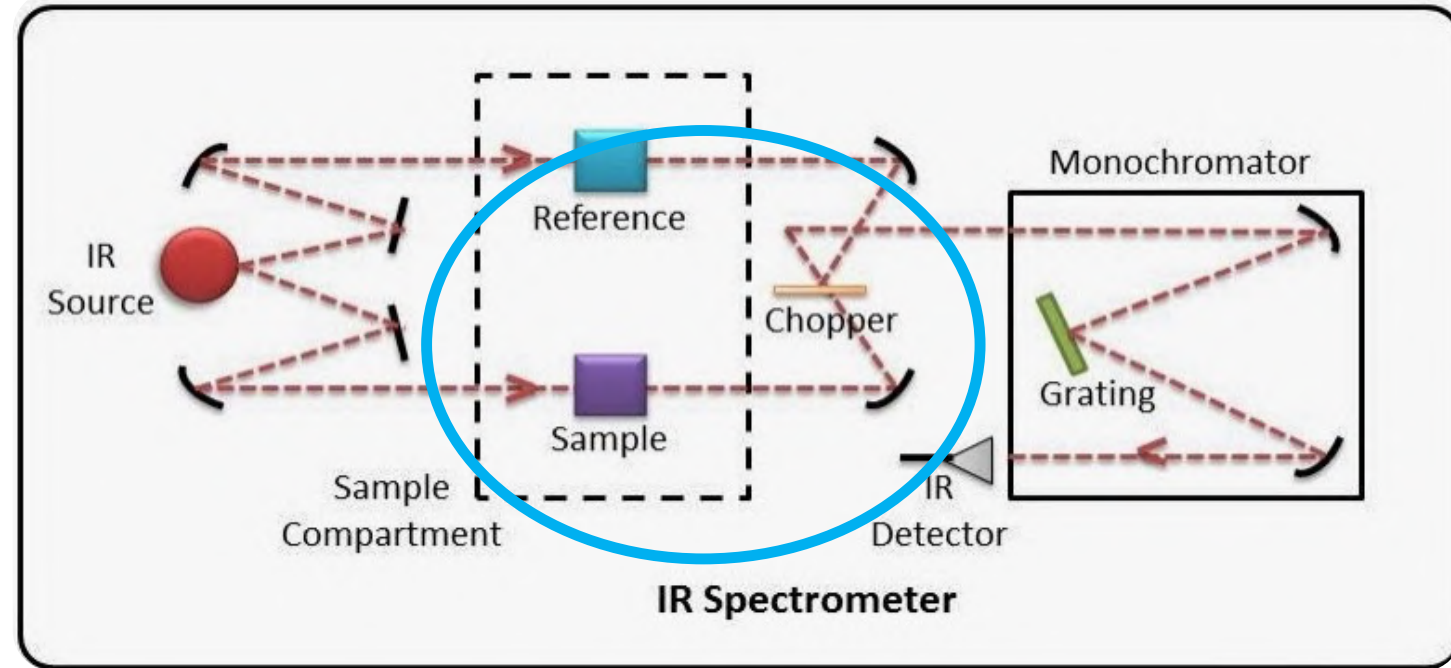
Tecnica spettroscopia di assorbimento.

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

La spettroscopia di assorbimento nelle regioni spettrali dell'IR viene utilizzata molto spesso a scopo qualitativo. Lo spettro IR della regione *fingerpint* (tra 4.000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ ) è praticamente unico per ogni molecola. Per l'identificazione della molecola si confronta lo spettro ottenuto con quello nelle banche dati.

Lo spettro IR, che riporta l'intensità dell'assorbimento (trasmittanza) in funzione della lunghezza d'onda, è caratterizzato da picchi riferibili a gruppi funzionali specifici, che fanno parte della struttura della molecola in esame.

Il gran numero di legami presenti nelle molecole forniscono spettri molto complessi, che costituiscono un'impronta digitale caratteristica ed unica per ogni molecola



*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*

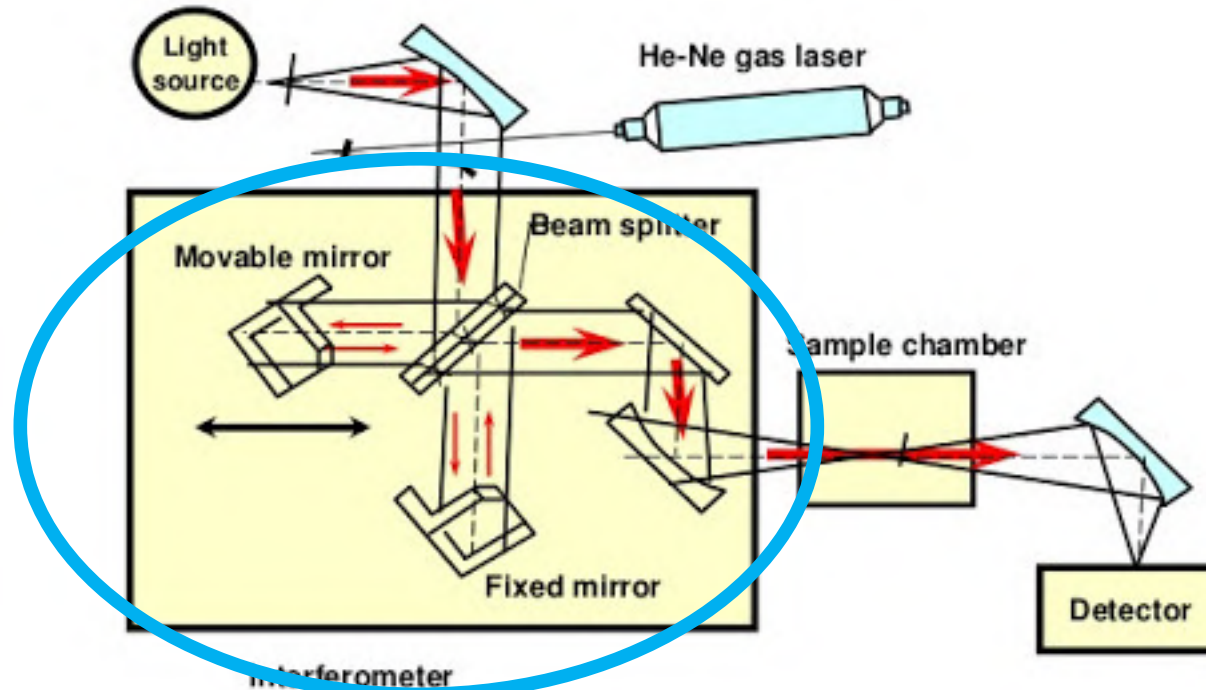
**FT-IR**

# Infrared spectroscopy - IR



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.



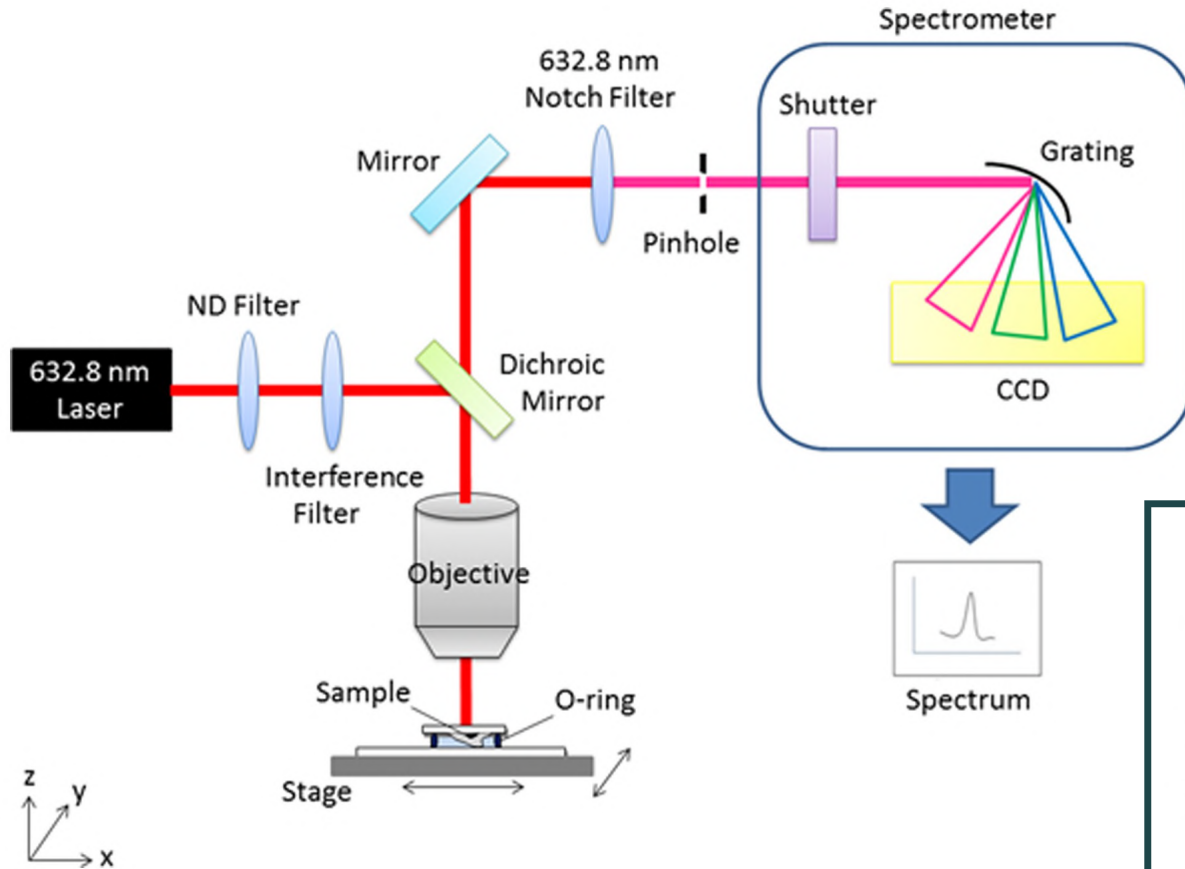
*Mentre gli spettrofotometri a dispersione misurano l'andamento del segnale nel tempo (scansione delle lunghezze d'onda), gli spettrofotometri a trasformata di Fourier registrano gli spettri in modo simultaneo alle varie lunghezze d'onda*

**FT-IR**

# Raman spectroscopy



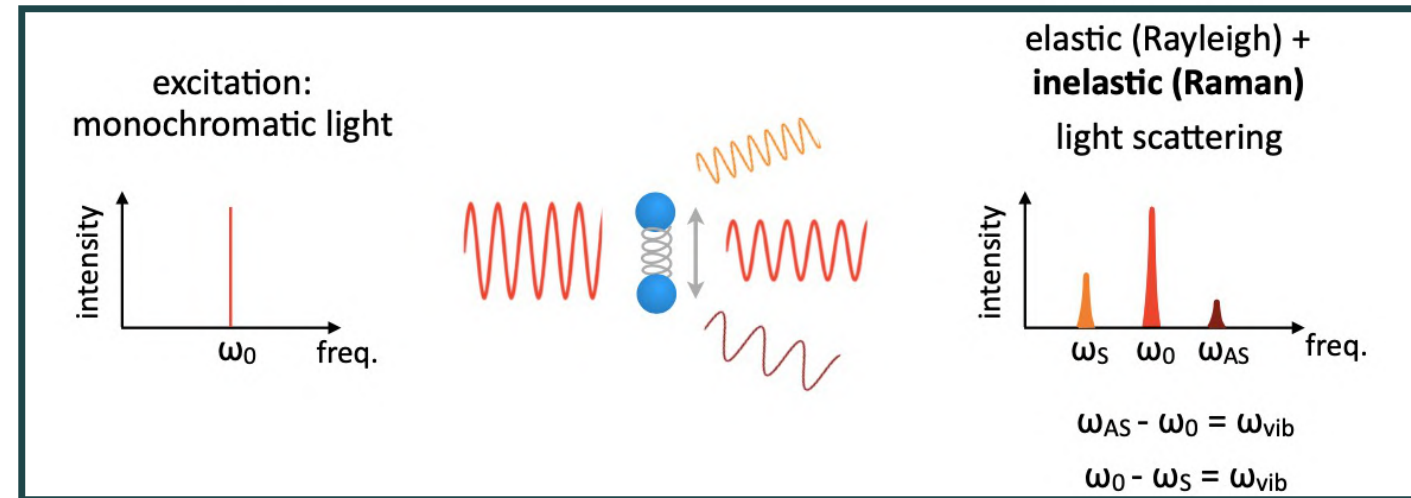
La spettroscopia di scattering Raman è una tecnica di analisi dei materiali basata sul fenomeno di diffusione di una radiazione elettromagnetica monocromatica da parte del campione analizzato.



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

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



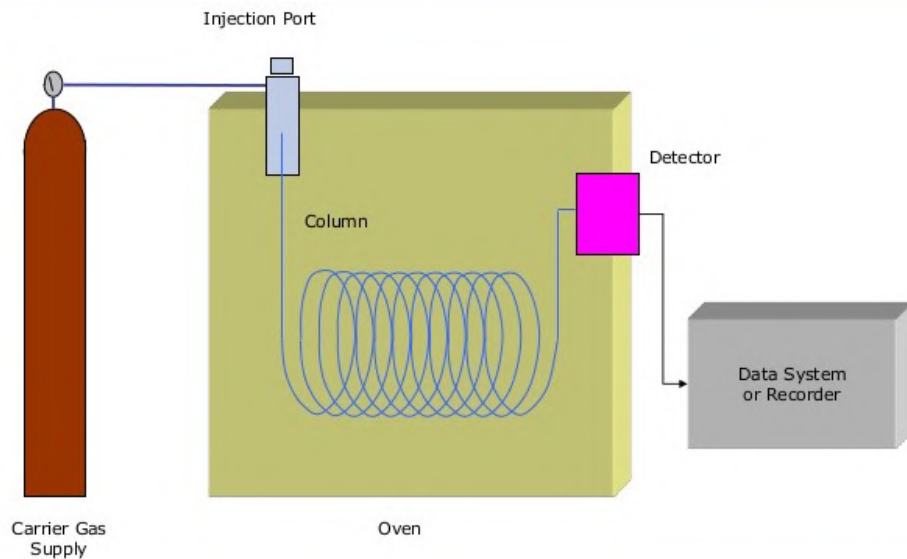
# Cromatografia e Spettrometria di Massa

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



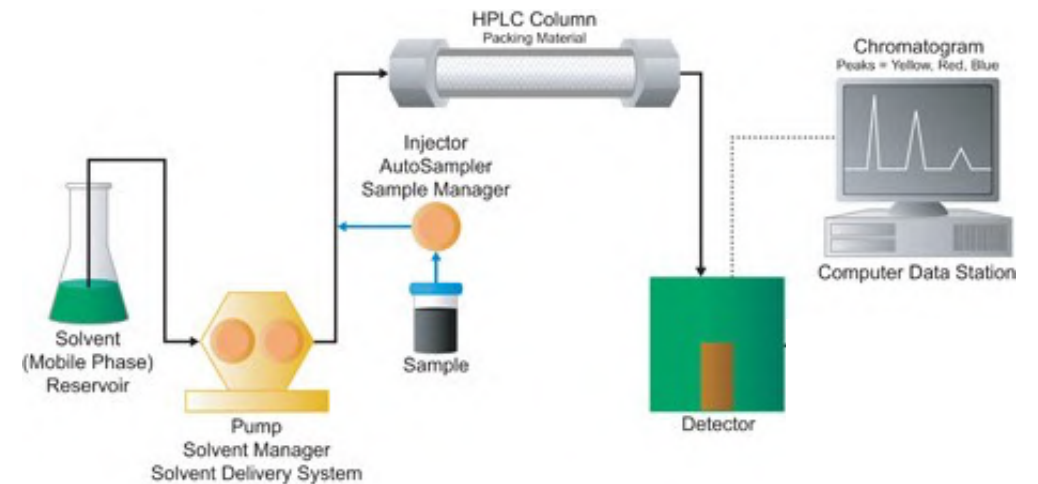
- Fase stazionaria: Film di fase inerte depositato in una colonna GC
- Fase mobile: un gas che fluisce attraverso la fase stazionaria e rappresenta la fase mobile (carrier gas).



## Cromatografia LIQUIDA



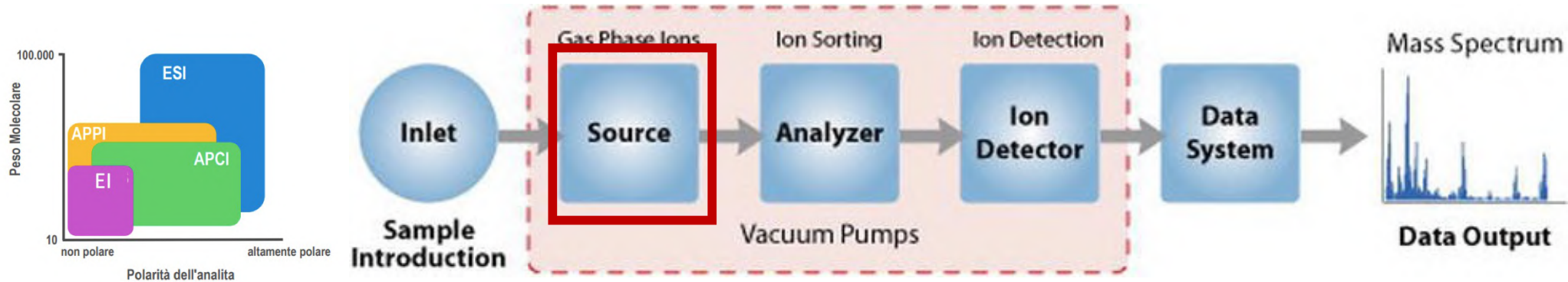
- Fase stazionaria: silice o silice funzionalizzata
- Fase mobile: Solvente (o miscele di solventi)





# 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

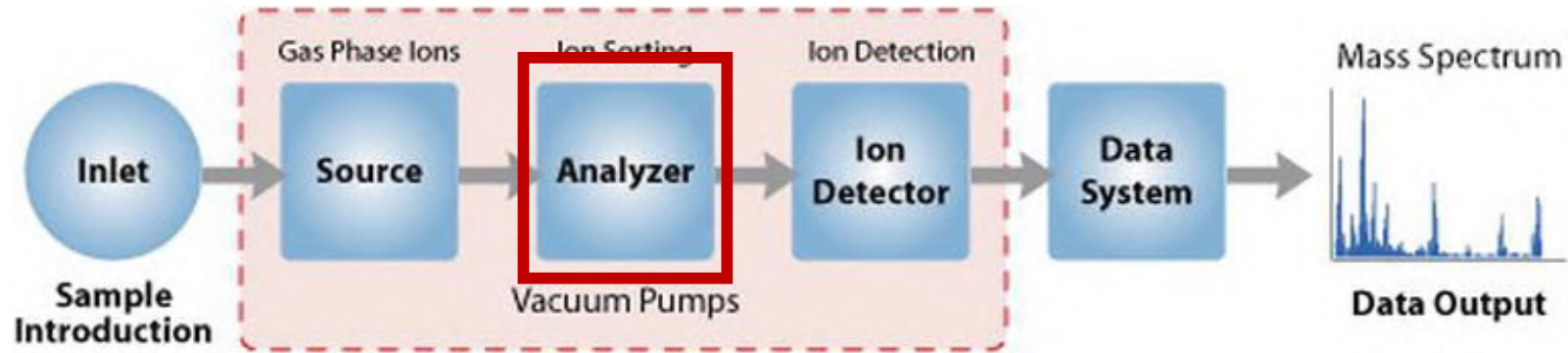
## 3. Nebulizzazione

- 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)

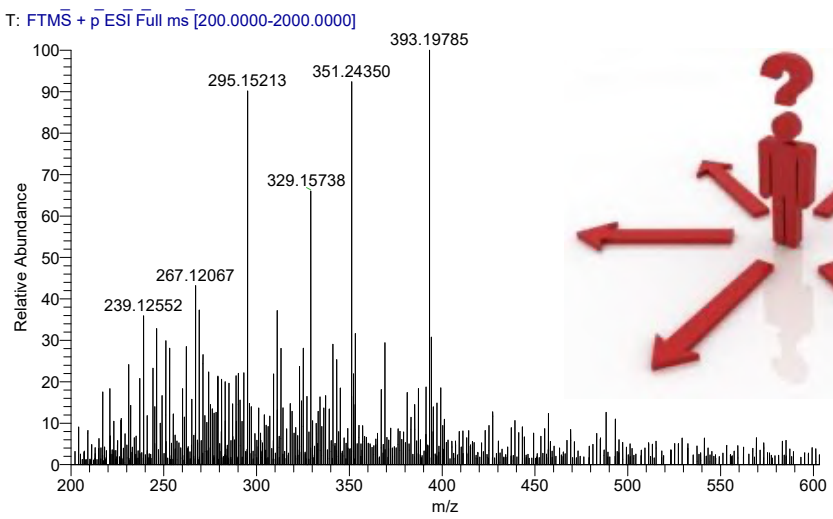
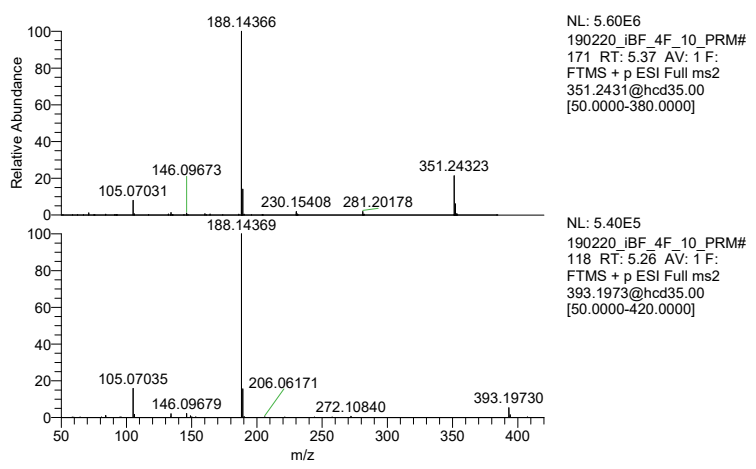
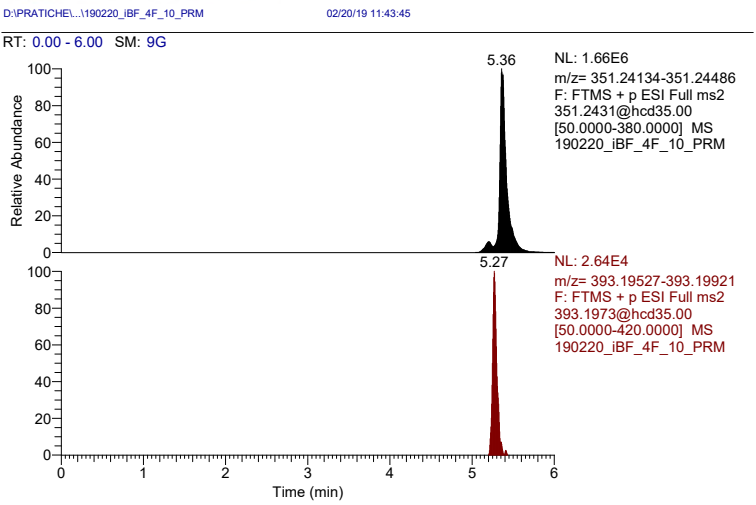
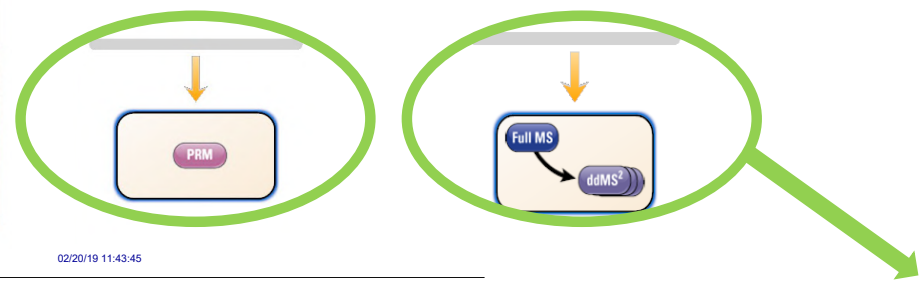
## ***MS***

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**



**Chromatogram overlay**

**Selected compound spectra**

**Results tables**

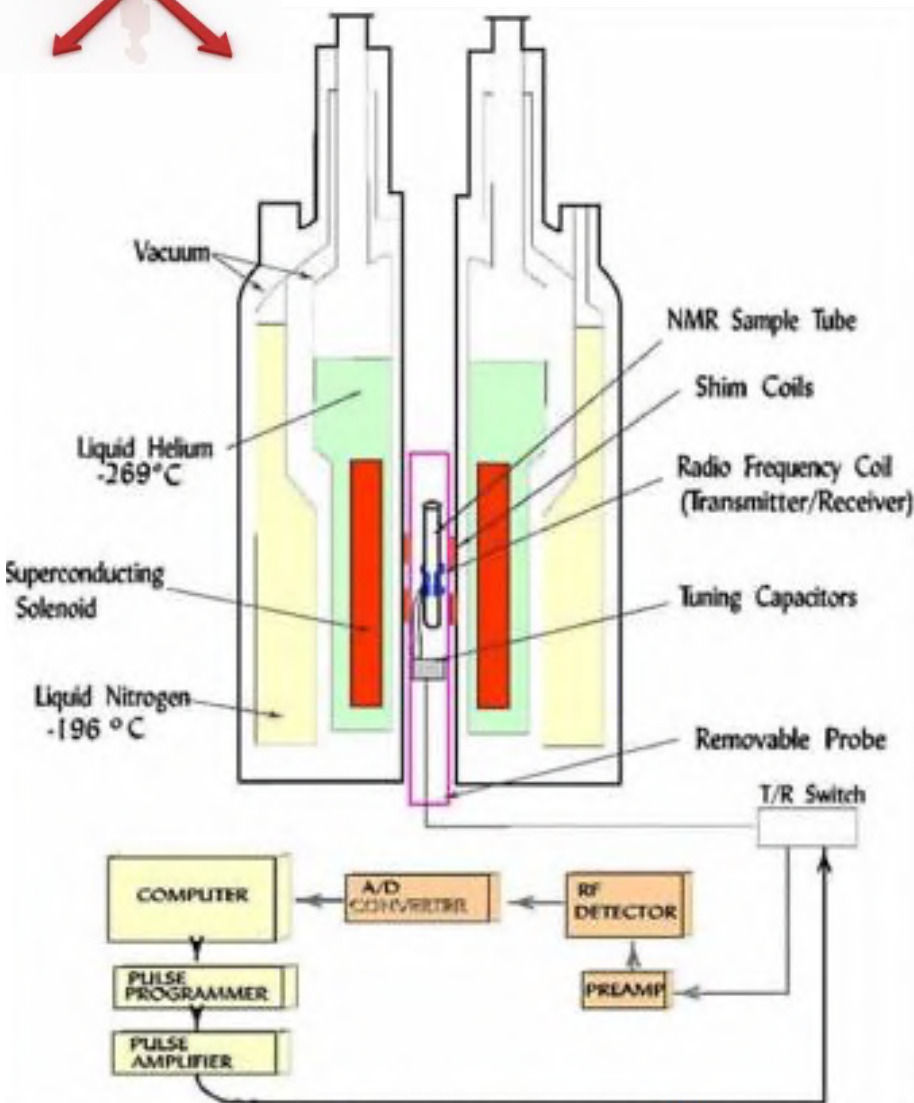
#	Checked	Name	Formula	Annotation Sc	Molecular Weight	RT [min]	Area (Max.)	# ChemSp	msCloud Best Match	MS2	Group Areas	Group CV [%]	Ratio	Log2 Fold Change	P-value	Adj. P-value	
1	<input type="checkbox"/>	Ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA)	C10 H16 N2 O8	97.3	292.09008	0.932	85836478826	1	97.3	5.39e10	7.35e10	11	10	0.714	-0.49	1.3e-2	8.1e-2
2	<input type="checkbox"/>	DA9185000	C12 H10 O 5	100.0	202.04498	0.834	20360836859	18	99.5	1.86e10	4.37e9	15	10	4.270	2.09	8.3e-3	8.1e-2
3	<input type="checkbox"/>	L-Norleucine	C6 H13 N O2	99.7	131.09453	2.009	17671595759	18	99.7	1.67e10	9.63e9	17	11	1.739	0.80	2.8e-2	1.6e-1
4	<input type="checkbox"/>	Betaine	C5 H11 N O2	98.5	117.07877	0.862	17227484266	14	98.5	1.79e10	1.61e10	17	11	1.056	0.08	9.3e-1	9.3e-1
5	<input type="checkbox"/>	D-(-)-Tryptophan	C11 H12 N2 O2	99.2	204.08974	3.113	14935877741	12	99.2	1.19e10	1.41e10	2	9	0.838	-0.26	8.3e-1	8.7e-1
6	<input checked="" type="checkbox"/>	Creatine	C4 H9 N3 O2	99.9	147.07877	0.932	13008974475	17	99.9	1.75e10	4.26e9	20	17	3.179	1.67	2.8e-3	1.1e-1
7	<input type="checkbox"/>	L-Phenylalanine	C9 H11 N O2	100.0	165.07892	2.513	13008974475	17	100.0	1.26e10	9.64e9	9	9	1.304	0.38	4.7e-2	2.0e-1
8	<input type="checkbox"/>	L-Tyrosine	C9 H11 N O3	99.5	181.07382	1.620	12173763807	18	99.5	8.37e9	1.10e10	12	8	0.763	-0.39	8.1e-2	2.8e-1
9	<input type="checkbox"/>	Creatinine	C4 H7 N3 O	99.3	113.05880	0.921	11284215174	2	99.3	1.06e10	6.67e9	14	11	1.619	0.70	1.6e-2	1.6e-1
10	<input type="checkbox"/>	L-Valine	C5 H11 N O2	100.0	117.07877	1.181	10762788065	14	100.0	1.07e10	6.09e9	16	8	1.753	0.81	2.1e-2	1.7e-1
11	<input type="checkbox"/>	Acetyl-L-carnitine	C9 H17 N O4	99.2	203.11558	1.329	10080578865	3	99.2	9.08e9	5.66e9	19	11	1.605	0.68	3.2e-2	2.1e-1
12	<input type="checkbox"/>	Benzene	C6 H6	100.0	78.04684	2.572	8828044750	18	100.0	8.37e9	6.19e9	11	11	1.351	0.43	8.1e-2	2.8e-1
13	<input type="checkbox"/>	L-Isoleucine	C6 H13 N O2	99.2	131.09453	1.921	8746385312	18	99.2	7.94e9	4.99e9	15	9	1.589	0.67	2.3e-2	1.3e-1
14	<input type="checkbox"/>	3-Methylsulfolene	C5 H8 O2 S	97.3	132.02440	1.356	8055302245	2	97.3	7.81e9	4.66e9	11	11	1.674	0.74	5.1e-2	2.1e-1

**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.

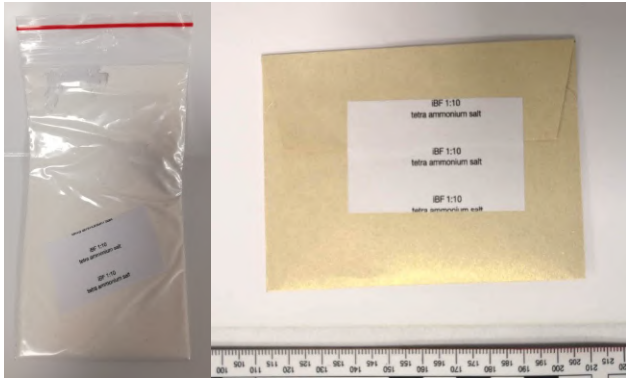


## Principio del metodo:

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

$^1\text{H}$

$^{13}\text{C}$



Dicembre 2019

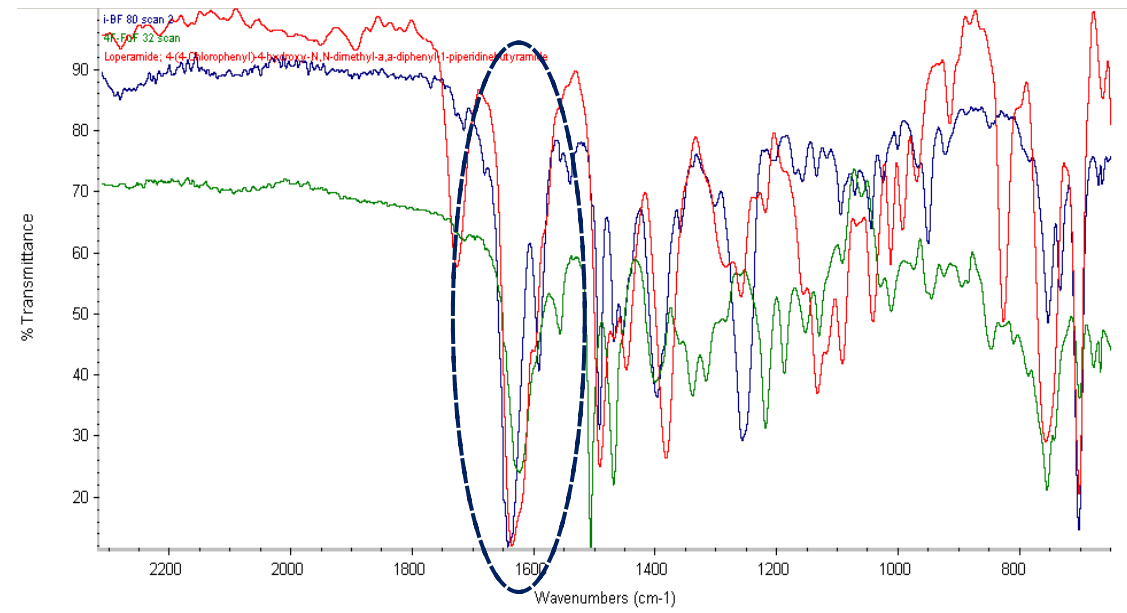
Nord Italia

Sequestro di una spedizione postale da mittente già precedentemente attenzionato

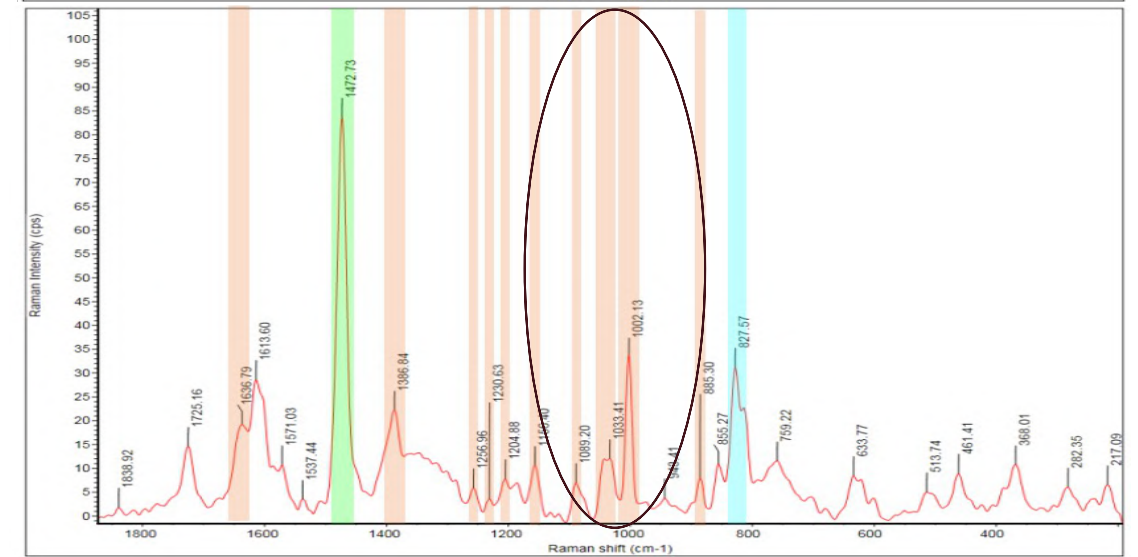
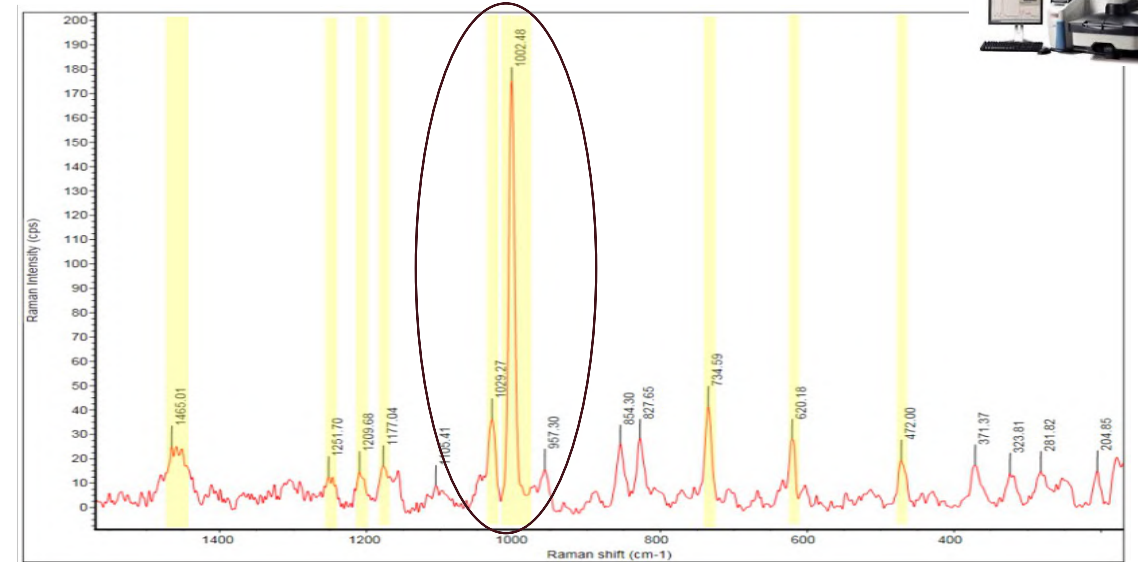
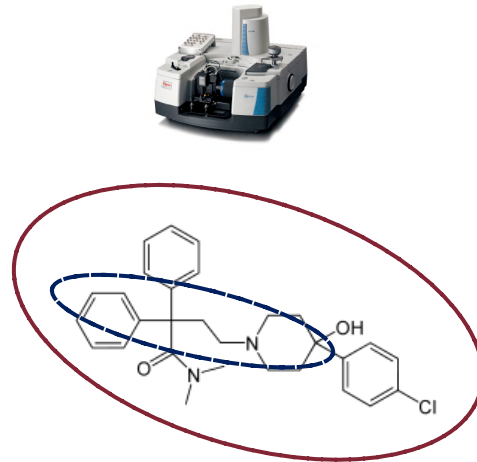
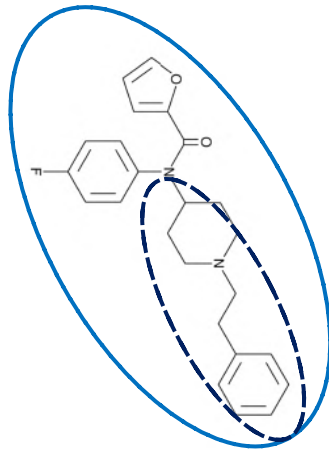
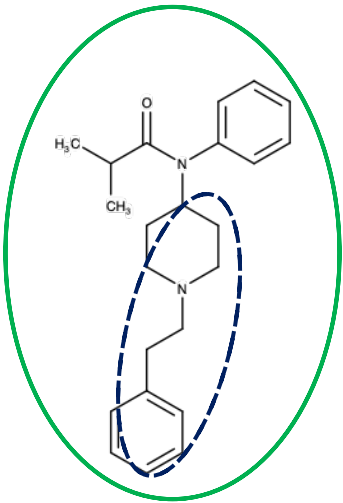
La confezione della spedizione riporta una etichetta che suggerisce la presenza di un derivato del fentanyl

Applicazione delle tecniche sopra citate alla risoluzione del caso



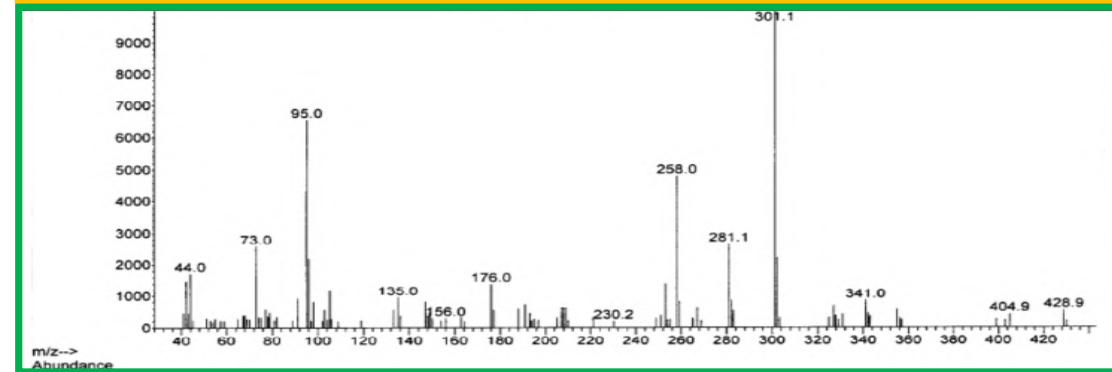
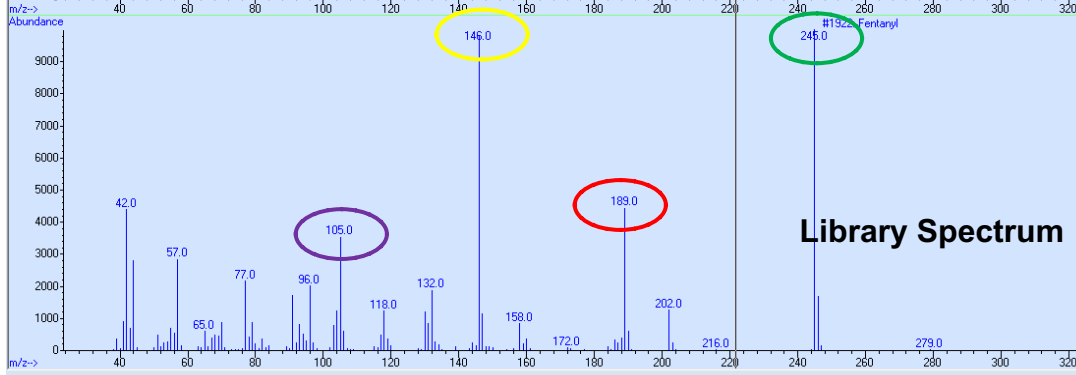
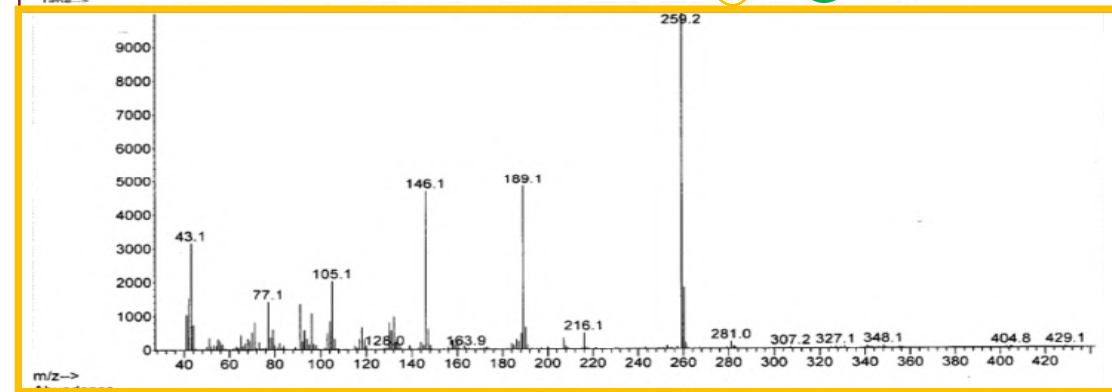
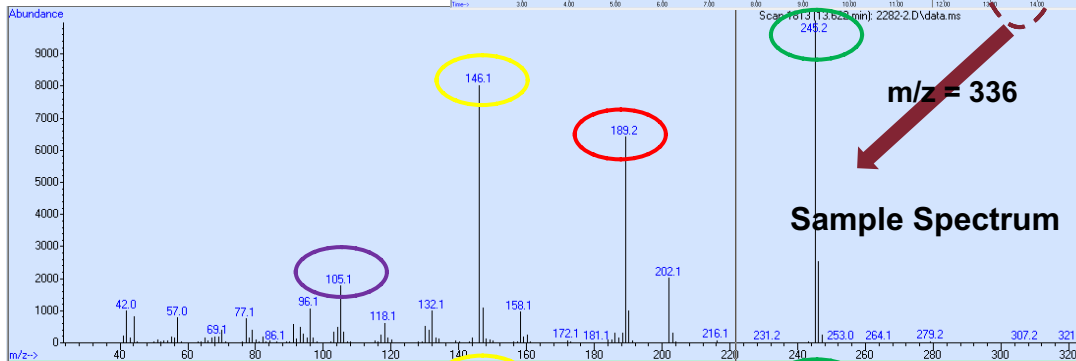
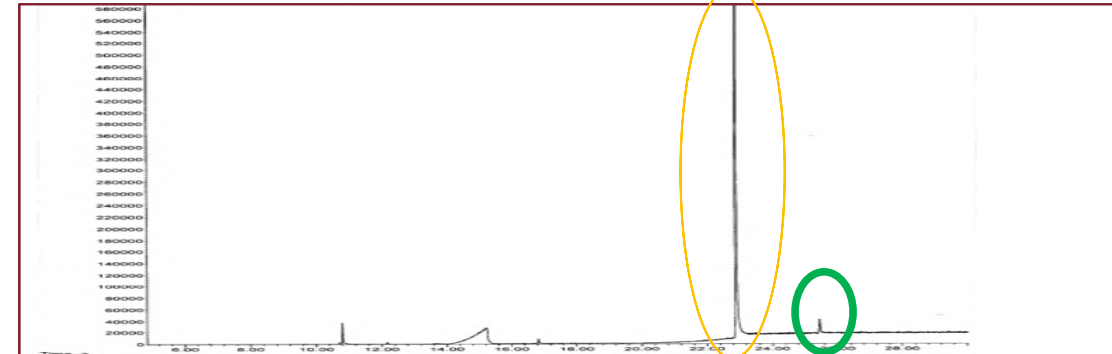
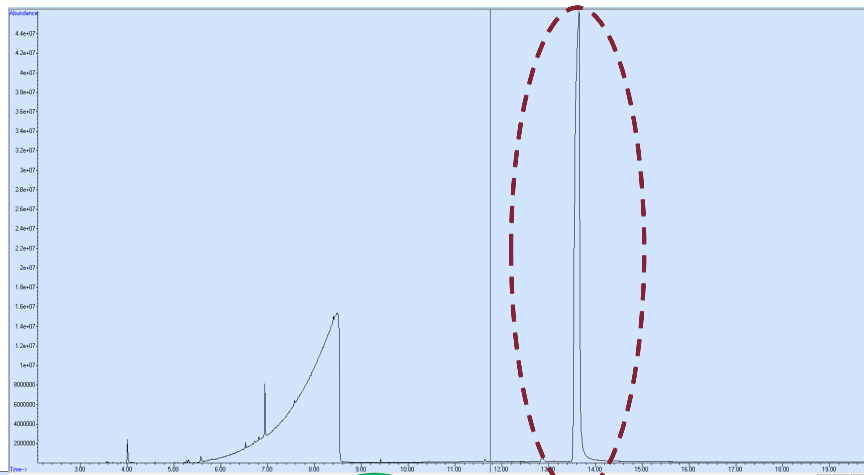


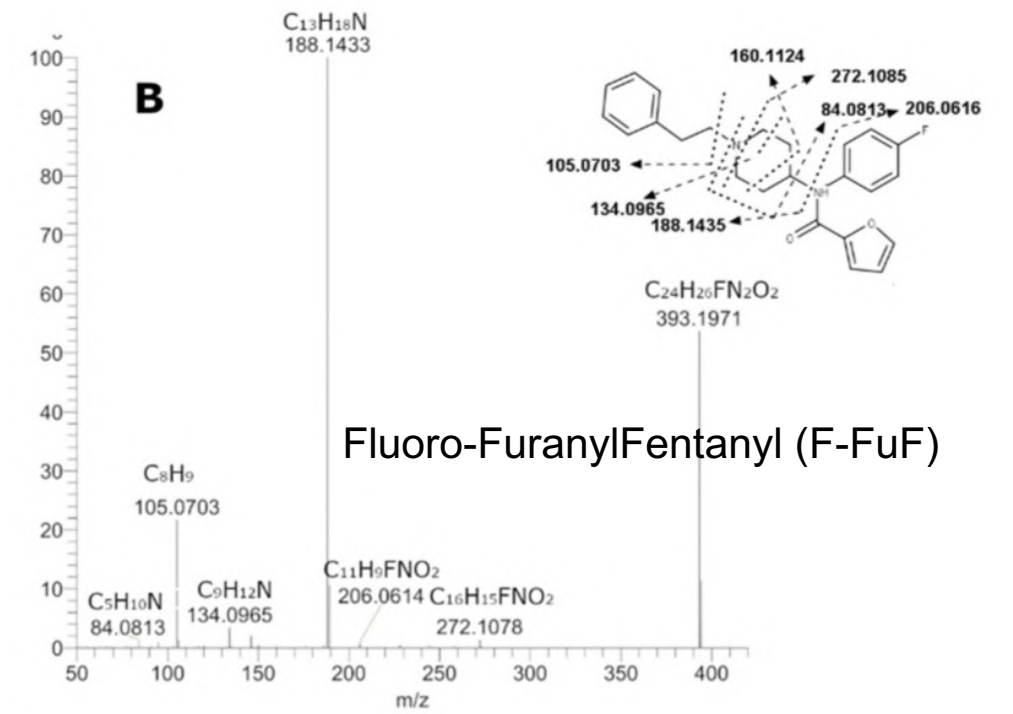
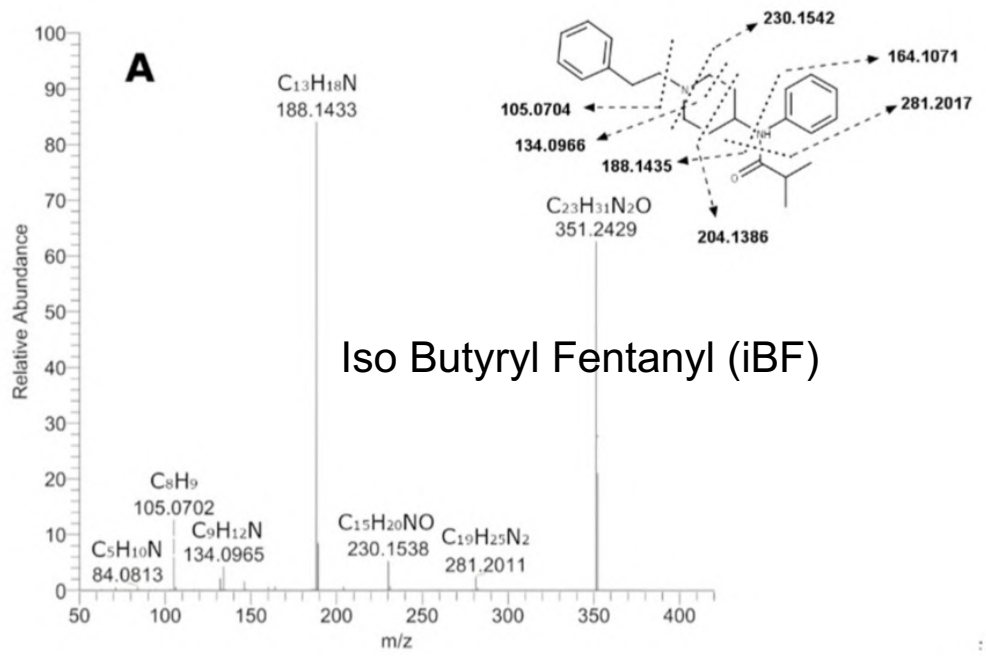
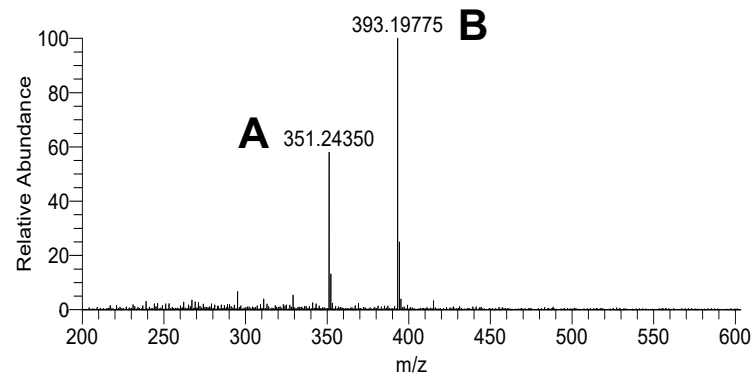
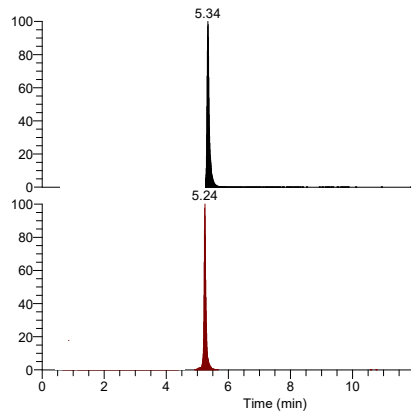
IR spectra of Furanyl Fentanyl (Blue), Isobutyryl Fentanyl (Green) and Loperamide (Red)

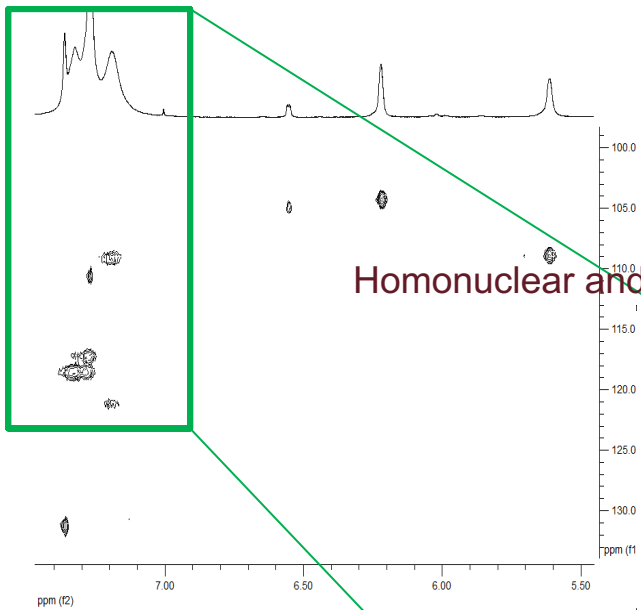




# Analisi GC-MS

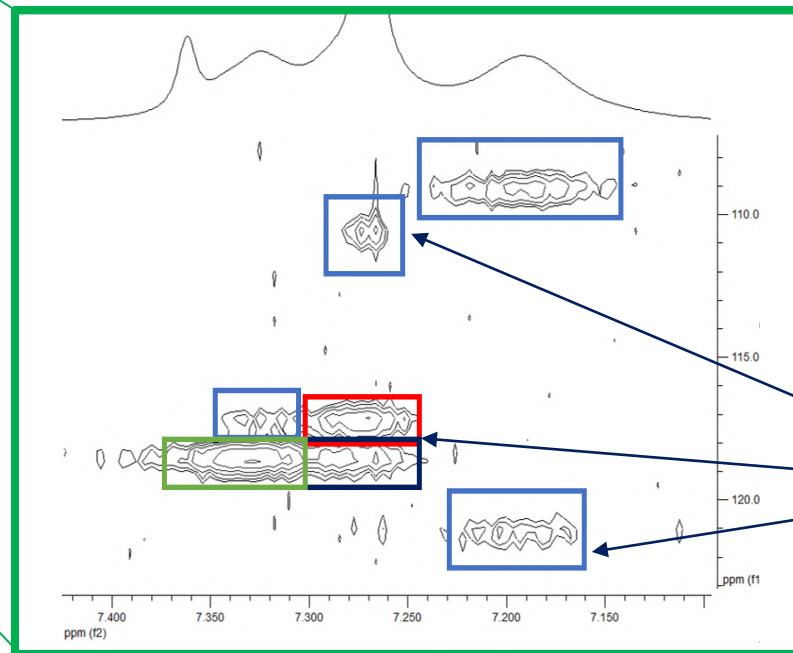






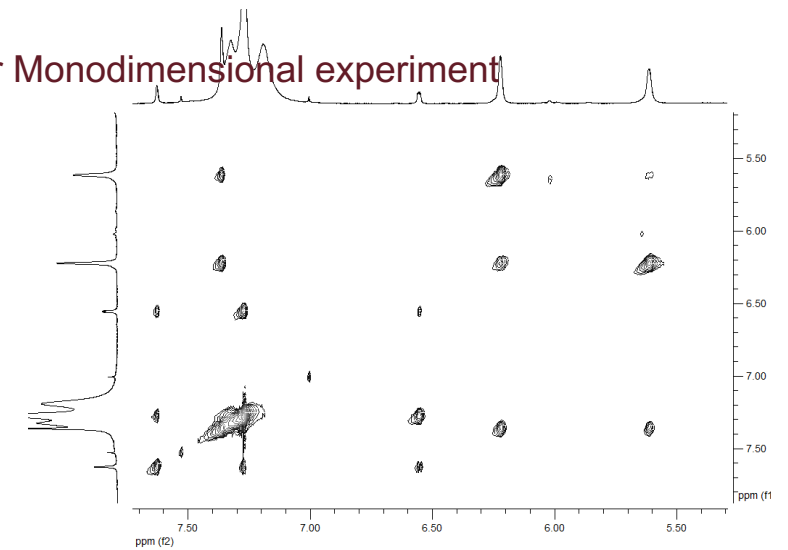
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectrum of 4F-FuF

Homonuclear and Heteronuclear Bidimensional experiment



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

Homonuclear Monodimensional experiment



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

resonances

STRUCTURE



# HighResNPS

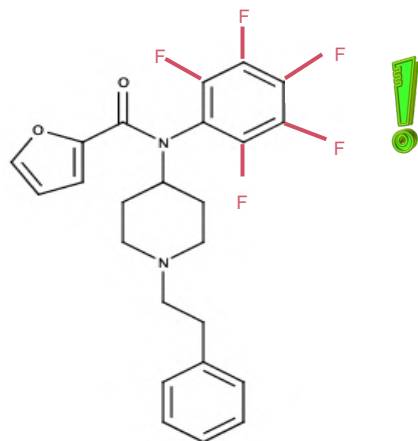
## HighResNPS

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.



4Fluoro-FuranylFentanyl (4F-FuF)



# Risultato

Forensic Chemistry 21 (2020) 100283



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Chemistry

journal homepage: [www.sciencedirect.com/journal/forensic-chemistry](http://www.sciencedirect.com/journal/forensic-chemistry)



## 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,\*</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>d</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

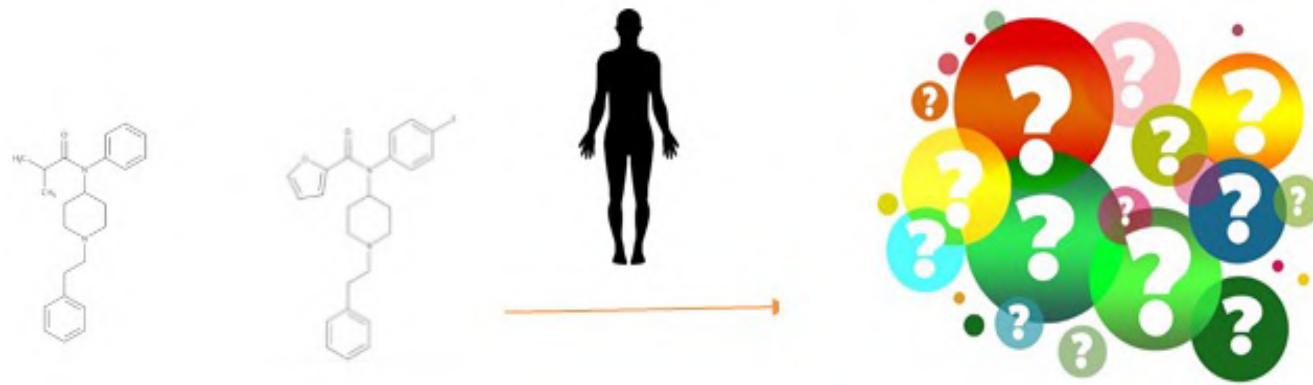
**Keywords:**  
Fentanyl  
IR  
Raman spectroscopy  
GC-MS  
LC-HRMS, NMR

### 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 2019. Isobutyrylfentanyl (IBF) and 4-Fluoro-Furanyl fentanyl (4F-FuF) were identified. A comprehensive elucidation of 4F-FuF by means of several analytical techniques, namely IR, Raman, GC-MS, LC-HRMS/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.



E se non fosse stata sequestrata in tempo?

Quali sono i suoi effetti collaterali?

Come possiamo capire se un soggetto la ha assunta?

Qualcuno la ha già assunta?

Cosa può fare il SSN per contrastare gli effetti indesiderati?



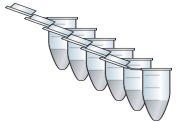
# Identificazione del Pathway metabolico di una sostanza

## 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:

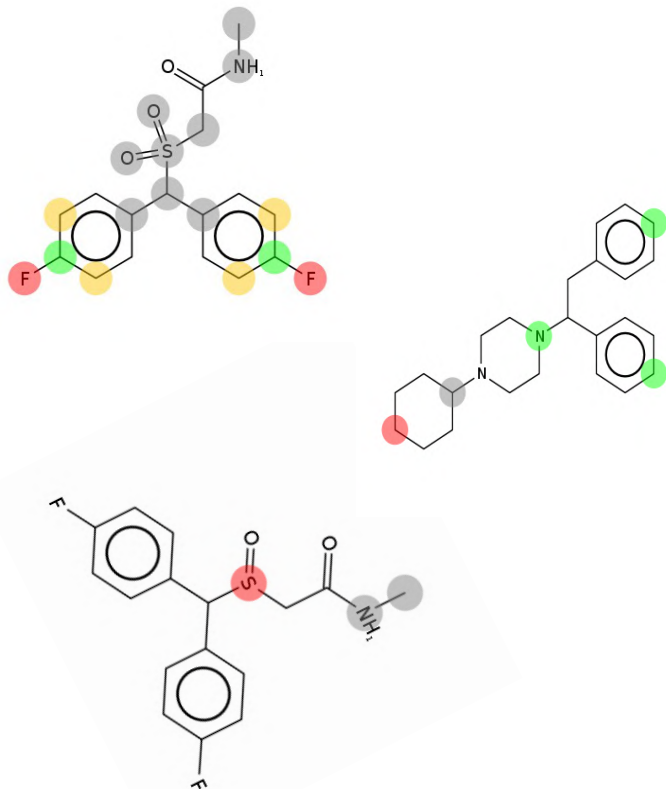
- Non trascurano nulla
- Informazione più ricca possibile
- Non escludono risultati frutto di uno solo dei passaggi

### CONTRO:

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



UHPLC-HRMS/MS

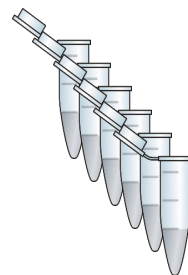


Colore assegnato	Valori di NOR
ROSSO	0,66 < NOR < 1
ARANCIO	0,33 < NOR < 0,66
VERDE	0,15 < NOR < 0,33
BIANCO	0 < NOR < 0,15
GRIGIO	Pochi dati

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



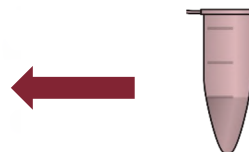
**500  $\mu$ l**  
 **$1 \times 10^6$  cell/ml**  
**20  $\mu$ M**



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



UHPLC-HRMS/MS



Prelievo surnatante



15000g 5 min

Solitamente, il campione viene preparato partendo da una soluzione della sostanza da analizzare, stabilizzandone, se necessario il pH mediante soluzioni tampone. Ottenuti i risultati delle cellule microsomiali si utilizzano anche le cellule epatiche, sia in sospensione, che le cellule platable. A seconda dei risultati ottenuti con le cellule microsomiali si decidono i 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. Al termine della procedura si ha cura di prelevare la surnatante senza andare a disturbare il pellet depositato sul fondo della provetta.

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

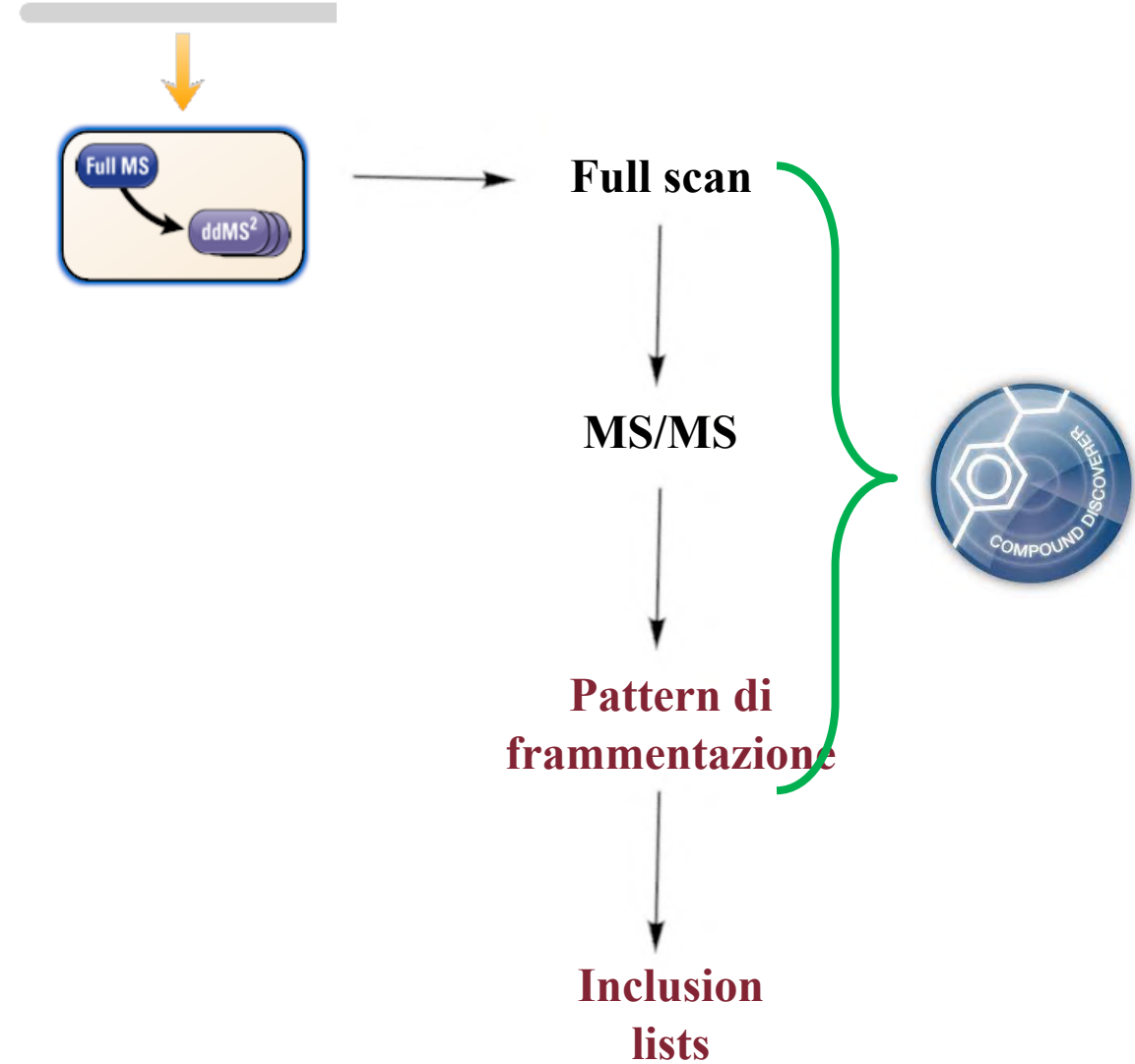
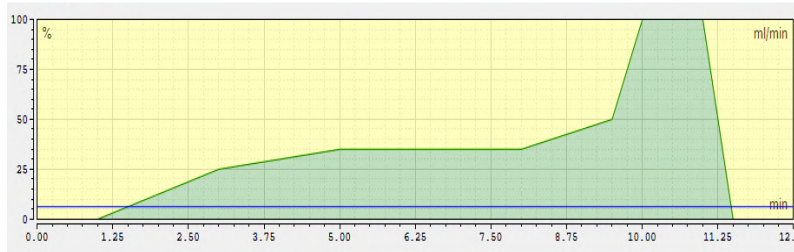


### ➤ Sorgente: H-ESI

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

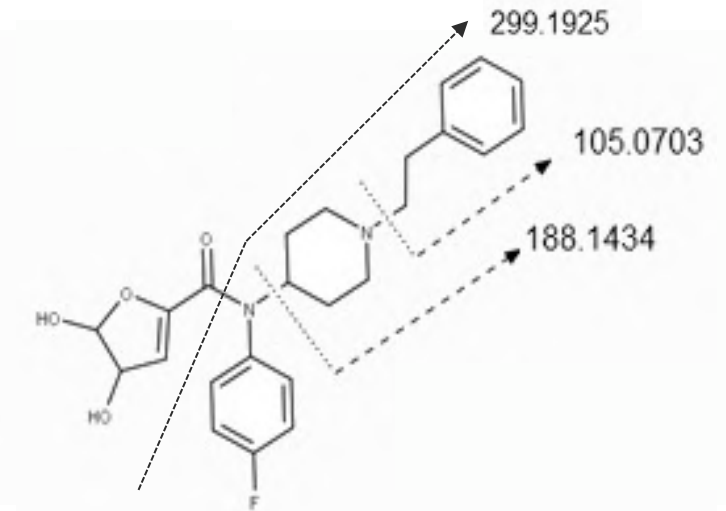
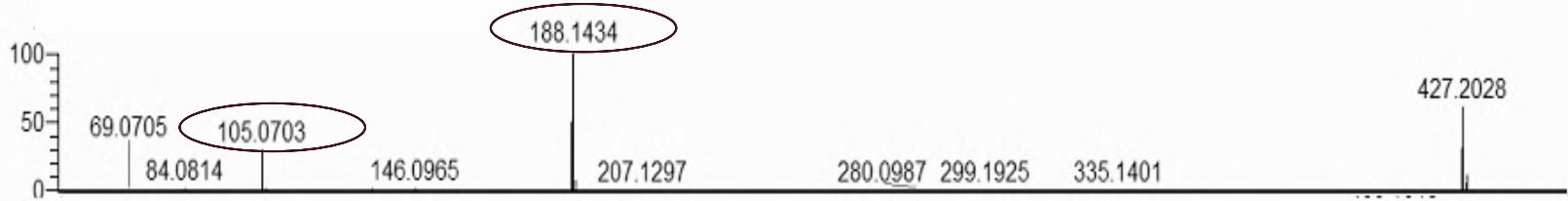
- **Colonna:** ACE Excel 2 C18-PFP 100 x 2.1 mm (1.6 um particles)
- **Fasi:**
  - A** H2O 0,1% HCOOH 10mM NH4COOH
  - B** 50:50 MeCN: MeOH 0,1% HCOOH
- **Flusso:** 0.500 mL/min



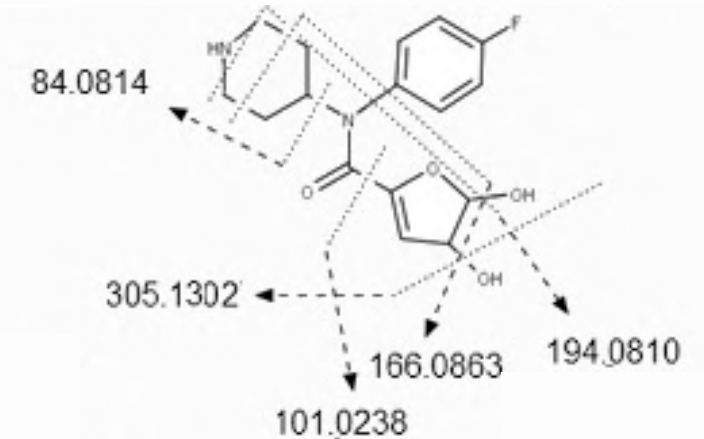
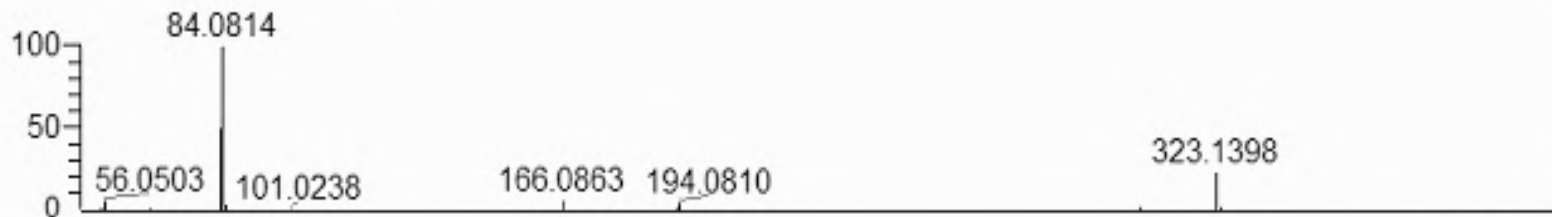
# Identificazione del Pathway metabolico di 4F-FuF

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

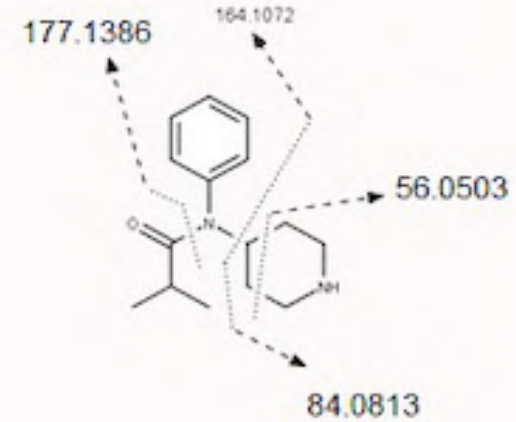
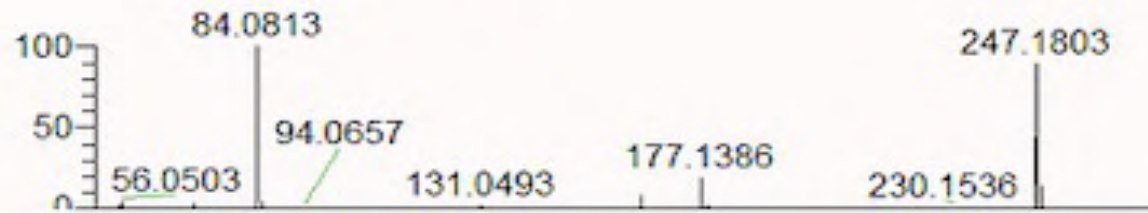




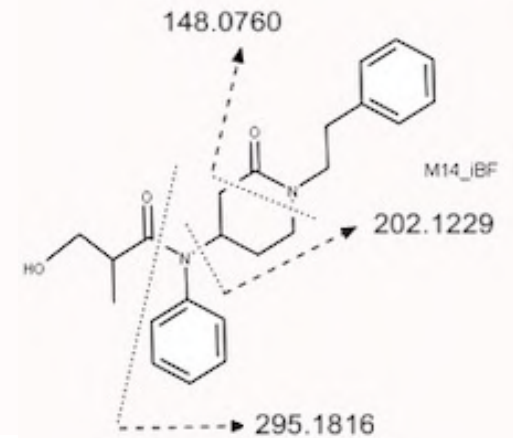
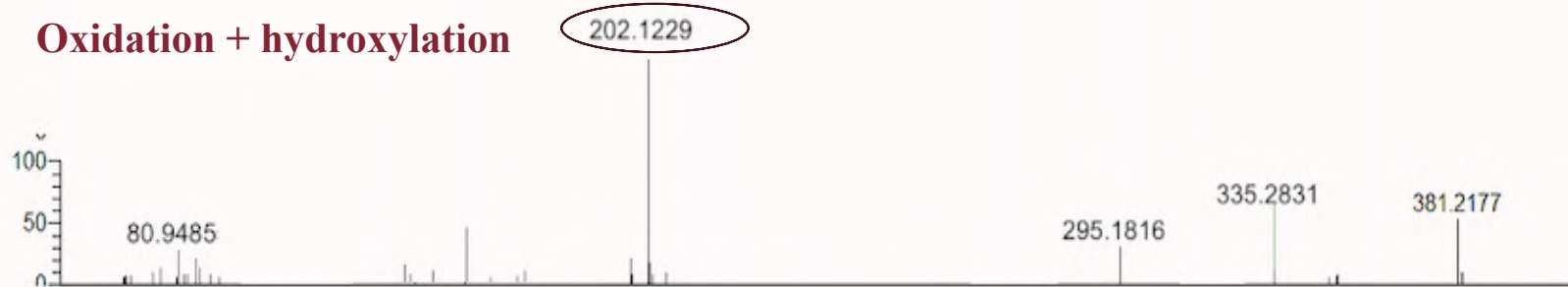
# Identificazione del Pathway metabolico di iBF

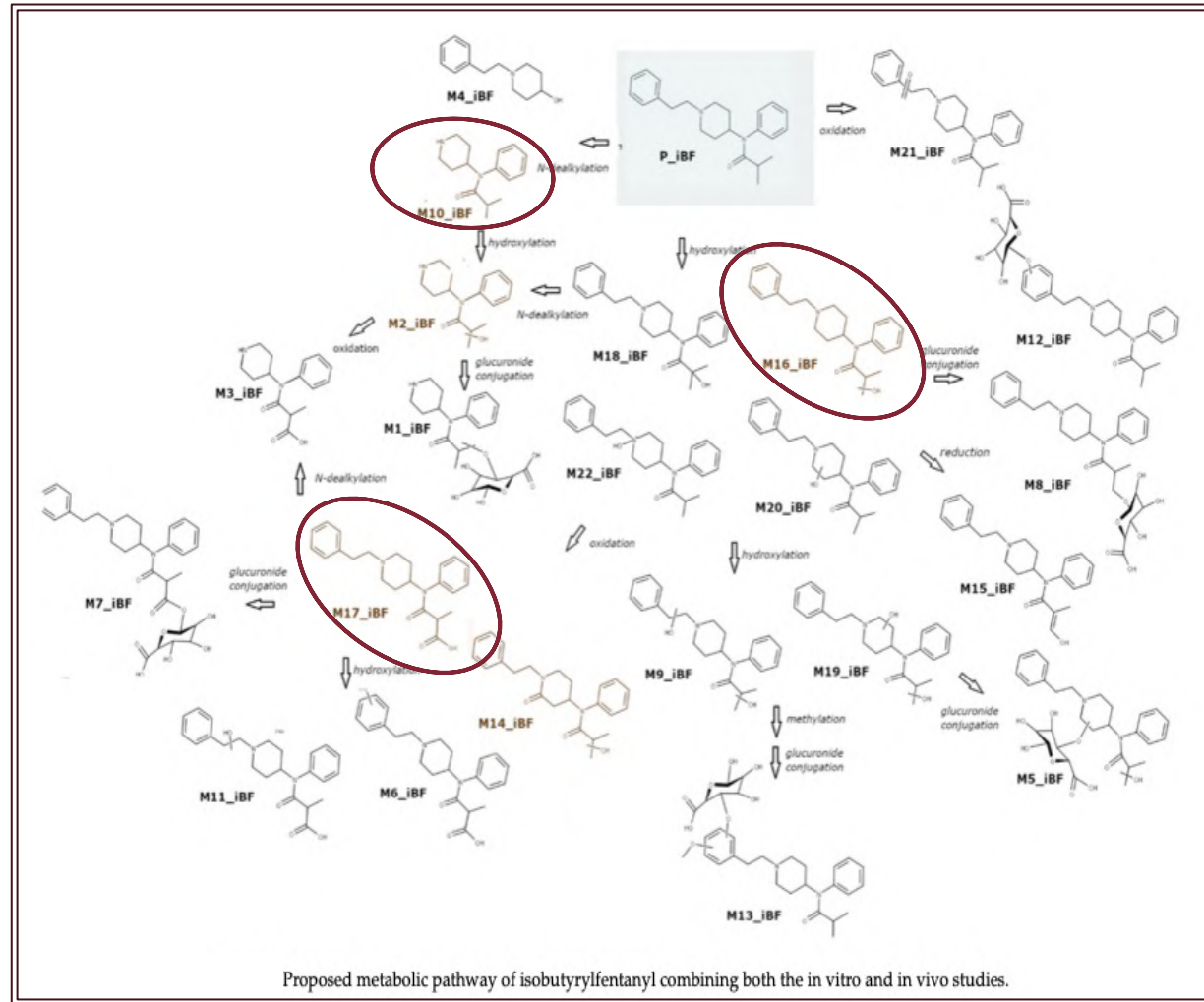
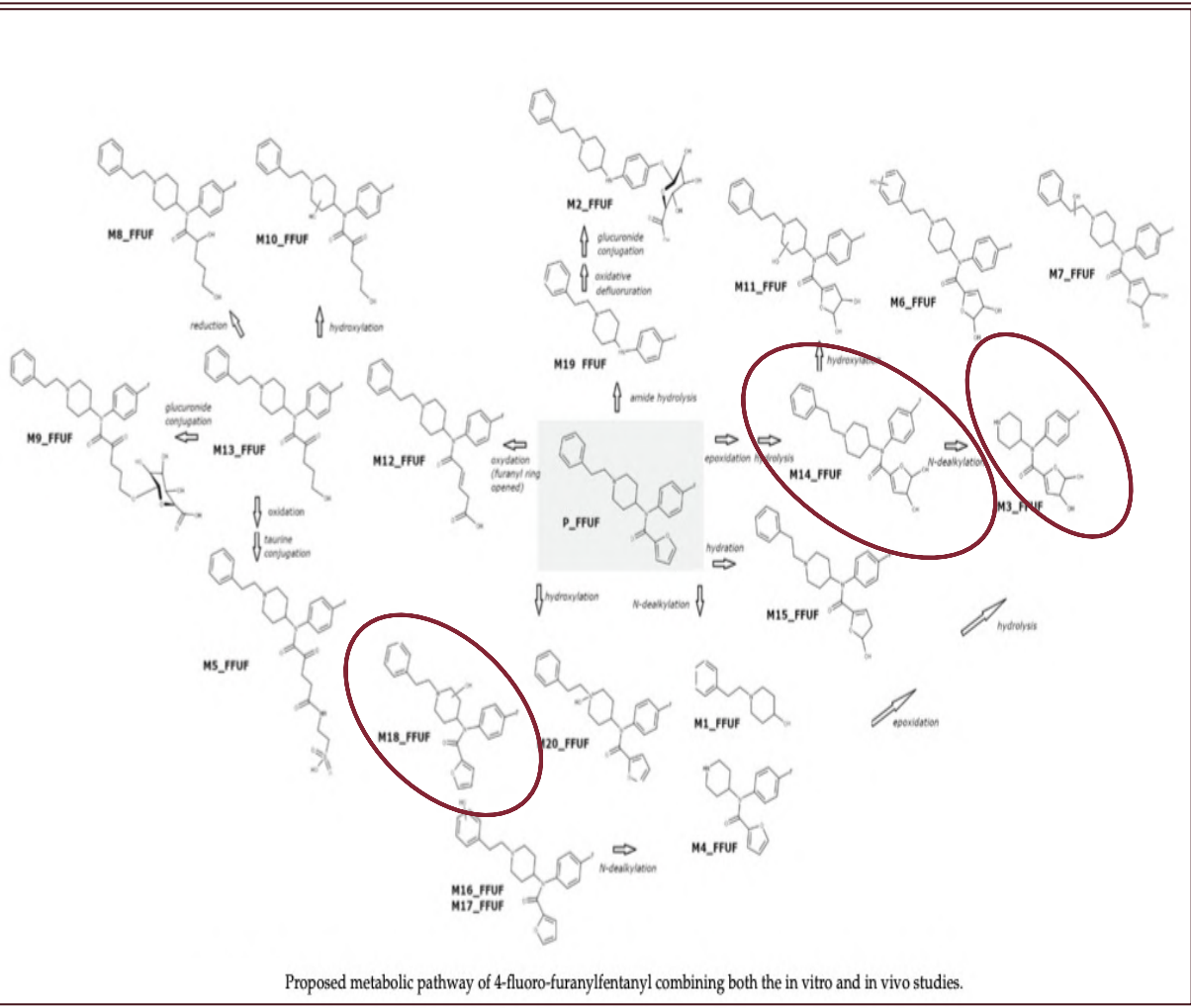
N-dealkylated metabolite was the relatively most intense but hydroxylation and subsequent carbonylation of the parent compound was also a main transformation.

## Oxidative N-dealkylation



## Oxidation + hydroxylation

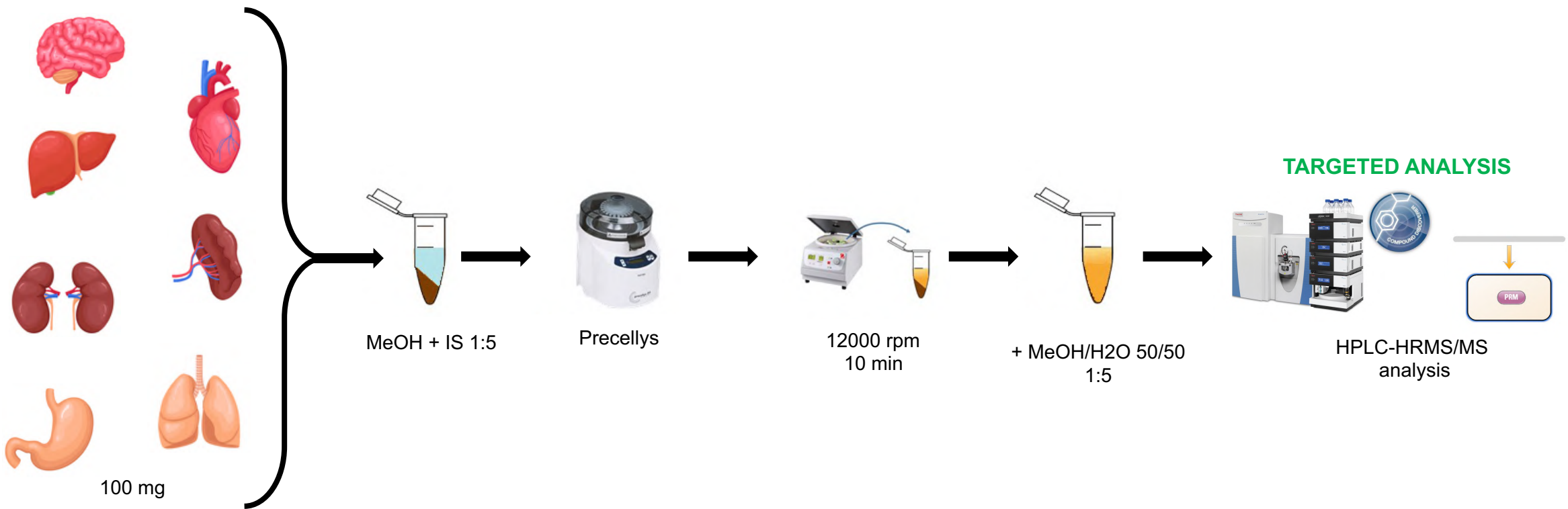




**L'incubazione della parent drug con epatociti è un buon approccio per identificare i metaboliti di una sostanza e cercare quindi i biomarkers di assunzione da inserire nei futuri metodi targeted.**



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.



Non sempre è possibile eseguire il Met-ID così come è stato illustrato per diversi motivi:

- Costi
- Strumentazione
- Problemi etici

## In Silico



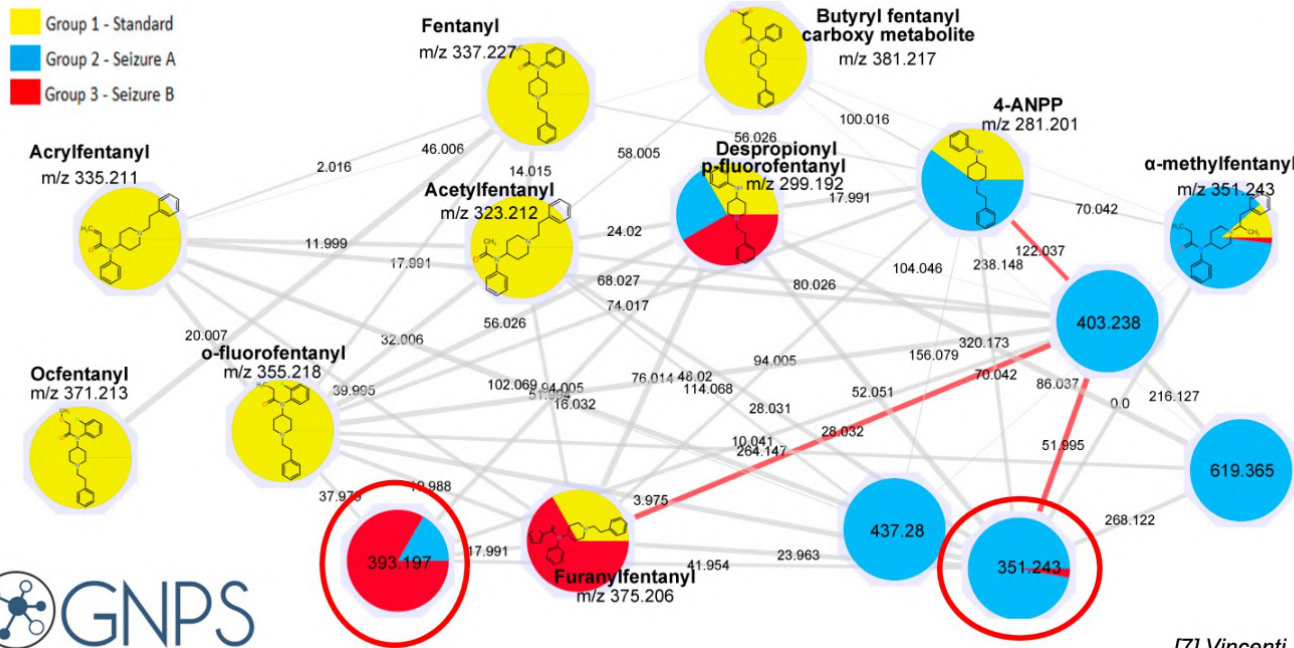
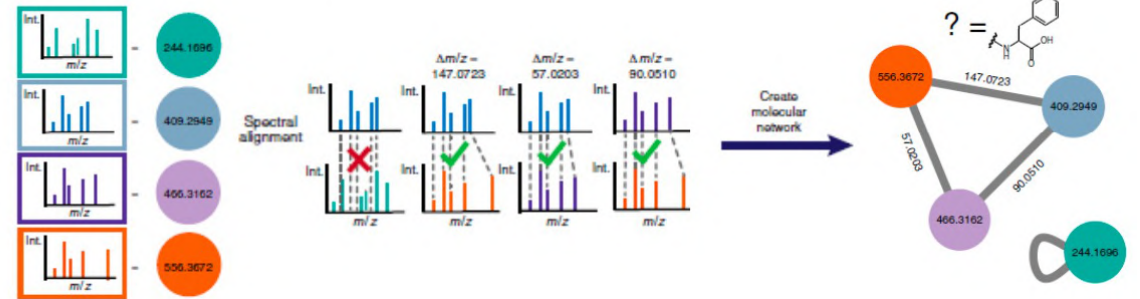
La strategia prevede che i risultati ottenuti dagli studi in silico vengano utilizzati per creare una inclusion list per analisi suspect.

Potrebbe non essere sufficiente...



# 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.



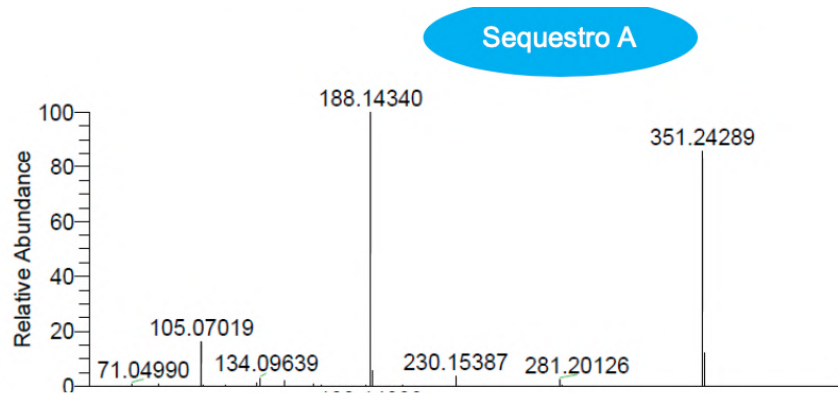
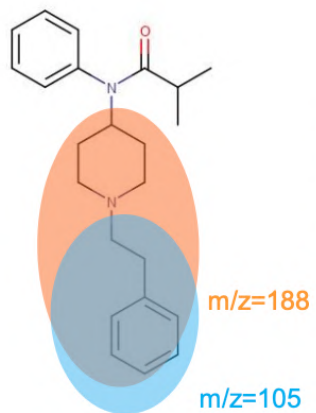
- ✓ Raccolta di spettri MS/MS di standard analitici appartenenti a classi note e creazione di «network standard» (nodi in giallo)
- ✓ Analisi di campioni incogniti sfruttando la molecular networking analysis; gli spettri che presentano analogie con quelli standard vengono messi in evidenza (nodi blu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

Identificazione di due nuovi analoghi del fentanyl in due sequestri

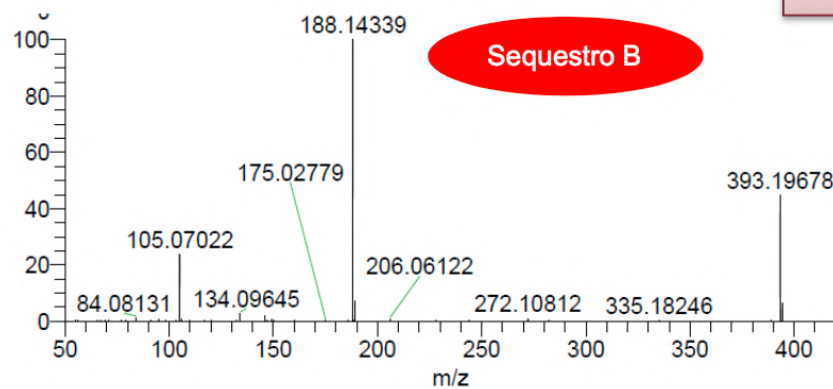
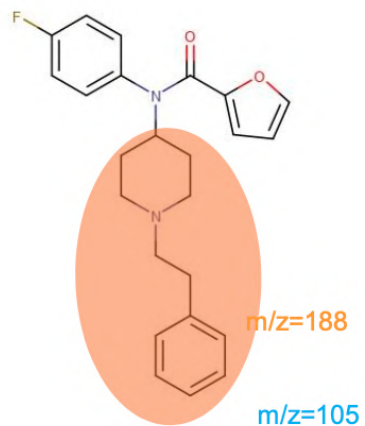
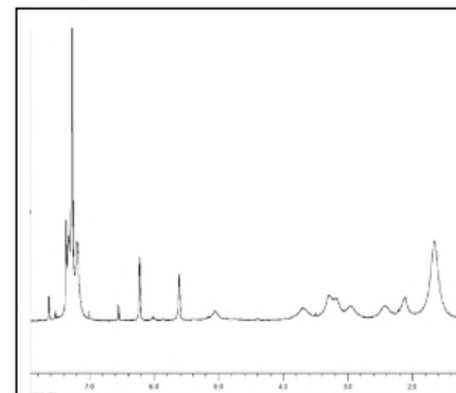
[7] Vincenti, F., Montesano, C., Di Ottavio, F., Gregori, A., *Front. Chem.* (2020) doi: 10.3389/fchem.2020.572952







**CONFERMA  
ATTRAVERSO ANALISI  
NMR**



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

## 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

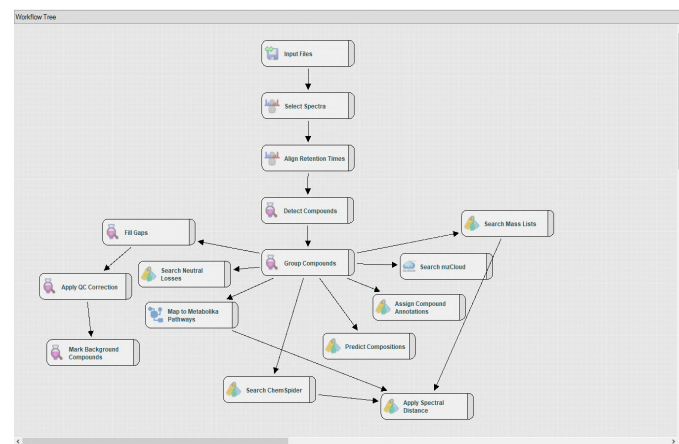


- **Metabolomica:** studio del profilo metabolico di un organismo e delle sue possibili alterazioni a carico di fattori quali dieta, sesso, età, stress, condizioni fisiopatologiche.

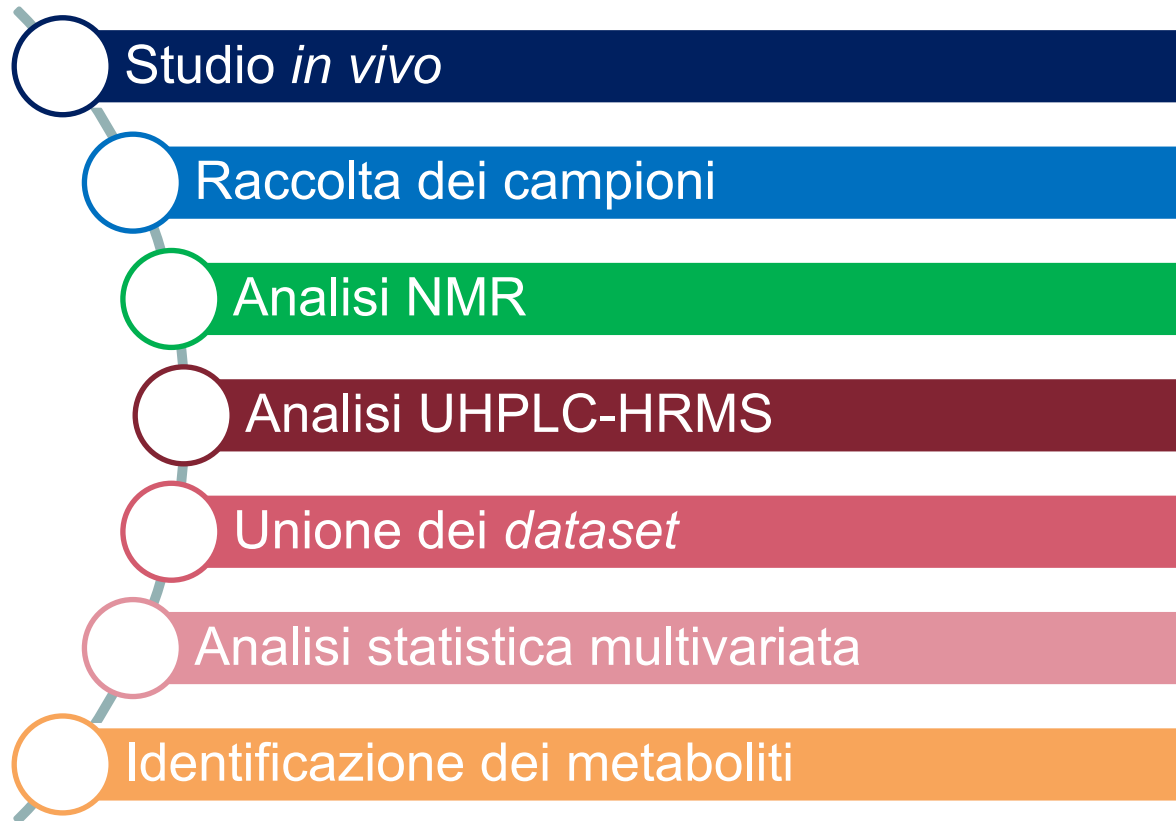
→ **CHIMICA CLINICA:** studio del profilo metabolico di **sogetti malati** rispetto ad un gruppo di controlli sani per la **diagnosi precoce** di malattie.

## 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**





*flaminia.vincenti@uniroma1.it*