



PRESIDENZA DEL CONSIGLIO DEI MINISTRI
Ministro per la Cooperazione Internazionale e l'Integrazione
Dipartimento Politiche Antidroga

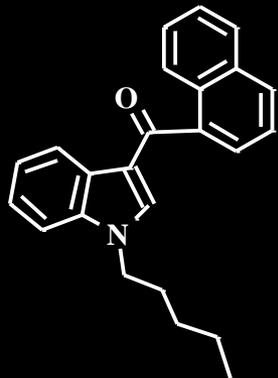
Nuove sostanze psicoattive (...e non solo)- strategie analitiche per la loro determinazione

Attività di ricerca del centro collaborativo «Tossicologia
Forense Università Cattolica del S. Cuore»

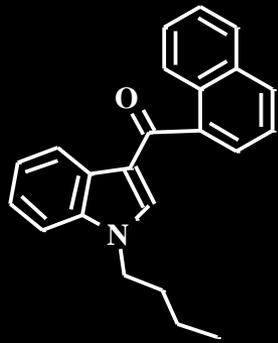
Sabina Strano Rossi – Referente Centro collaborativo

New Drugs - UPDATE SULLE NUOVE SOSTANZE PSICOATTIVE - NSP

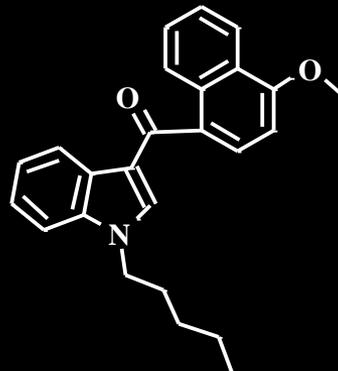
Aggiornamento tecnico scientifico e strategia nazionale di intervento. Roma, 24 settembre 2013



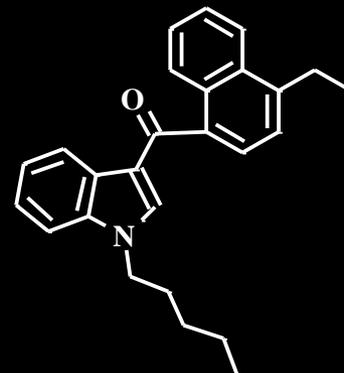
JWH-018



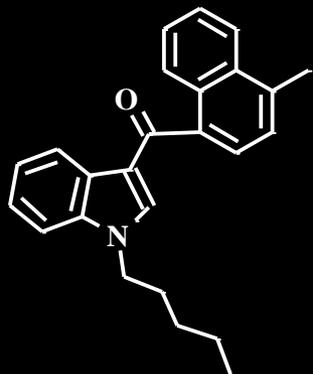
JWH-073



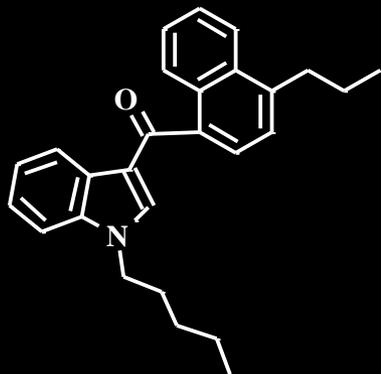
JWH-081



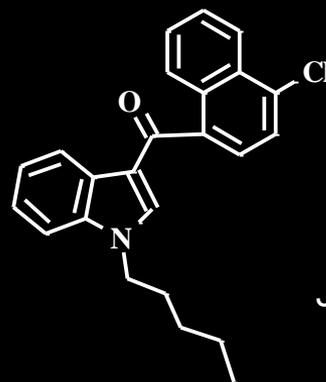
JWH-210



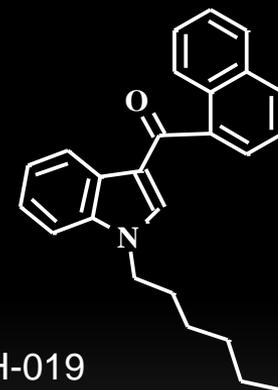
JWH-182



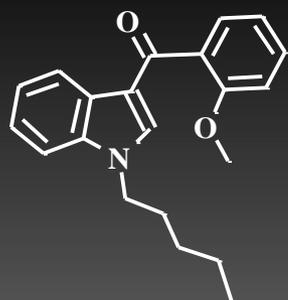
JWH-122



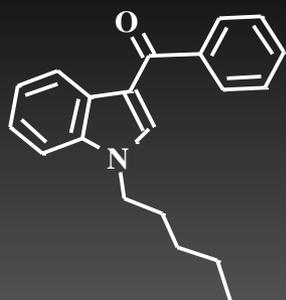
JWH-398



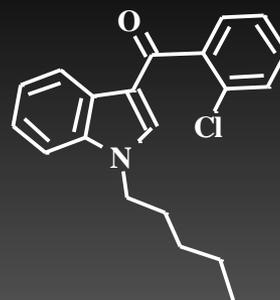
JWH-019



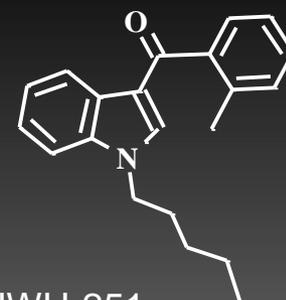
JWH-250



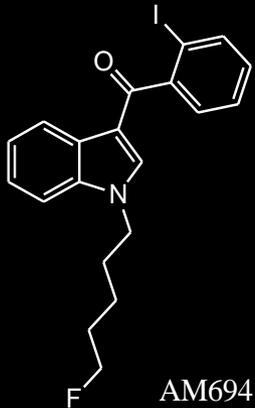
JWH-167



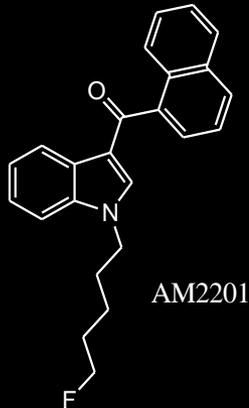
JWH-203



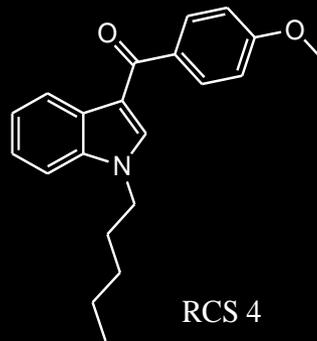
JWH-251



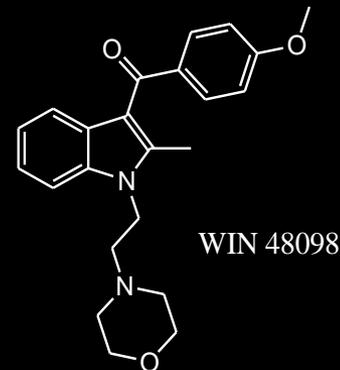
AM694



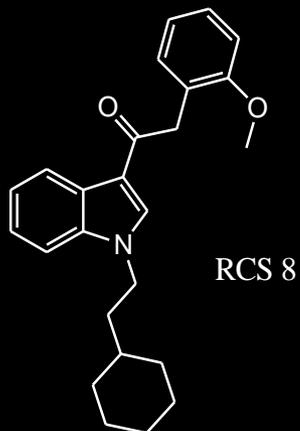
AM2201



RCS 4



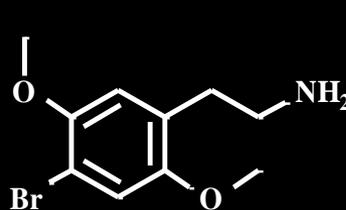
WIN 48098



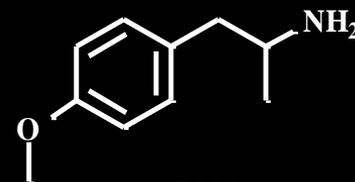
RCS 8



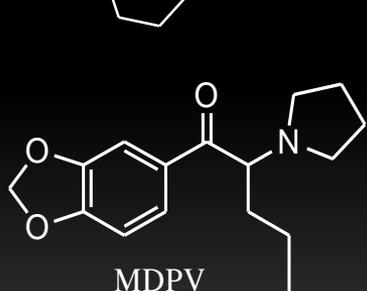
AM 2233



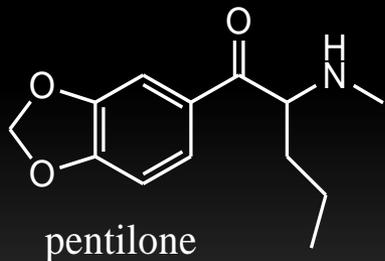
Br



PMA



MDPV



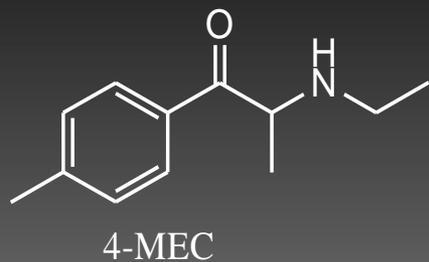
pentilone



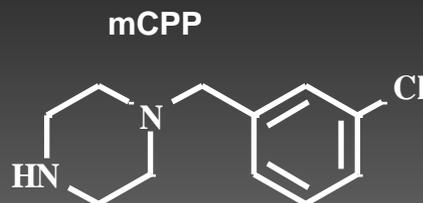
methylone



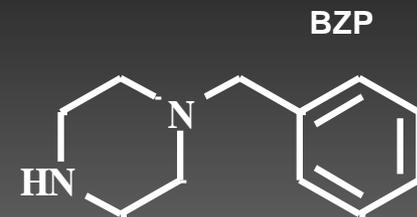
mephedrone



4-MEC



mCPP



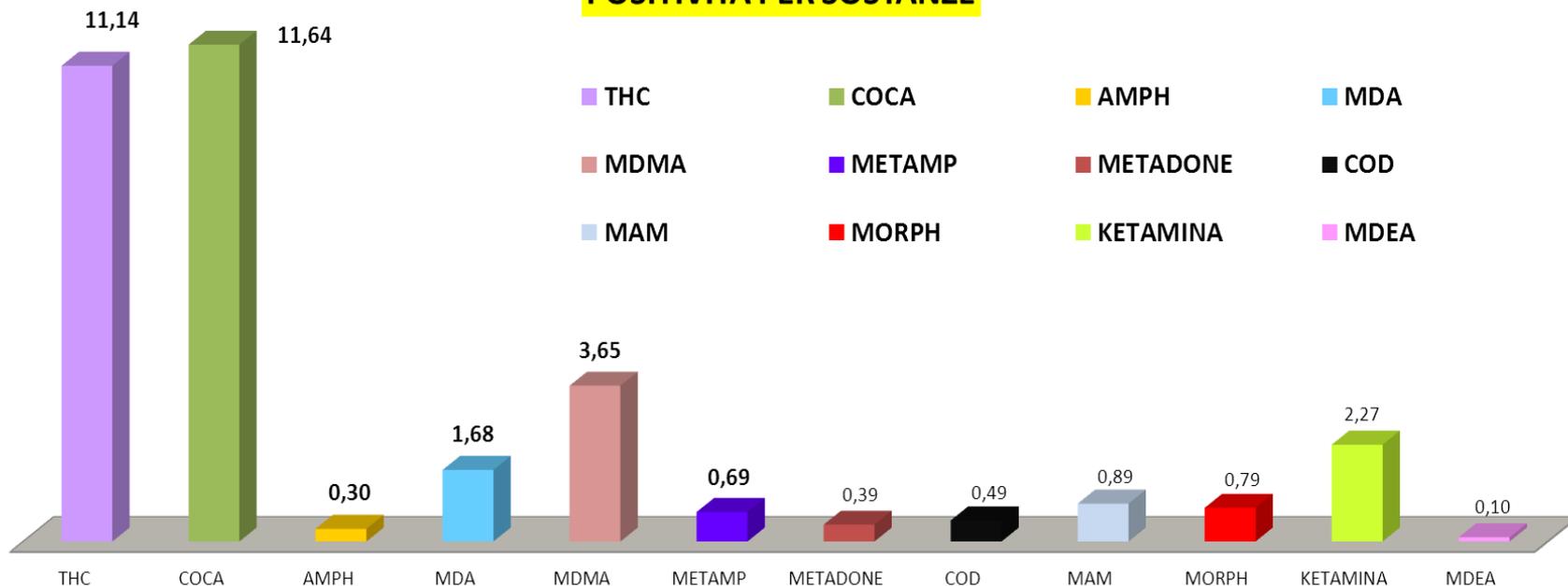
BZP



Progetto Toxtest Studio sperimentale su sistemi di drug-testing rapidi

Positivi alla guida sotto l'effetto

POSITIVITÀ PER SOSTANZE



NSP: su 400 campioni
1 benzilpiperazina
1 MDPV
1 4-MEC

Progetto Smart Stop

attivazione di misure di controllo degli esercizi commerciali che vendono prodotti contenenti sostanze pericolose per la salute

Attività del Laboratorio di Tossicologia Forense:

- Identificazione di NSP in sequestri di sostanze incognite
- Identificazione di Steroidi anabolizzanti, stimolanti ed altre sostanze non riportate in etichetta in integratori alimentari.

- Collaborazione con il RIS di Roma, Colonnello Ripani, Maggiore Peluso, Tenente Colonnello Rossi

Come identificare le nuove sostanze?

TEST Preliminari



- ✓ SPOT test: molte NPS reagiscono (Liebermann, Marquis,) ma NON tutte

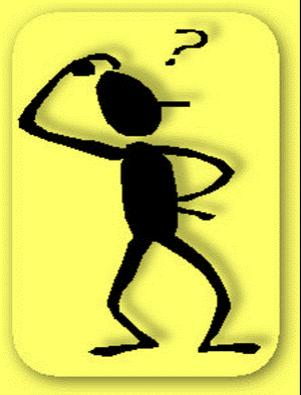


- ✓ On site kits: solo per alcune NPS



Come identificare con certezza le nuove sostanze?

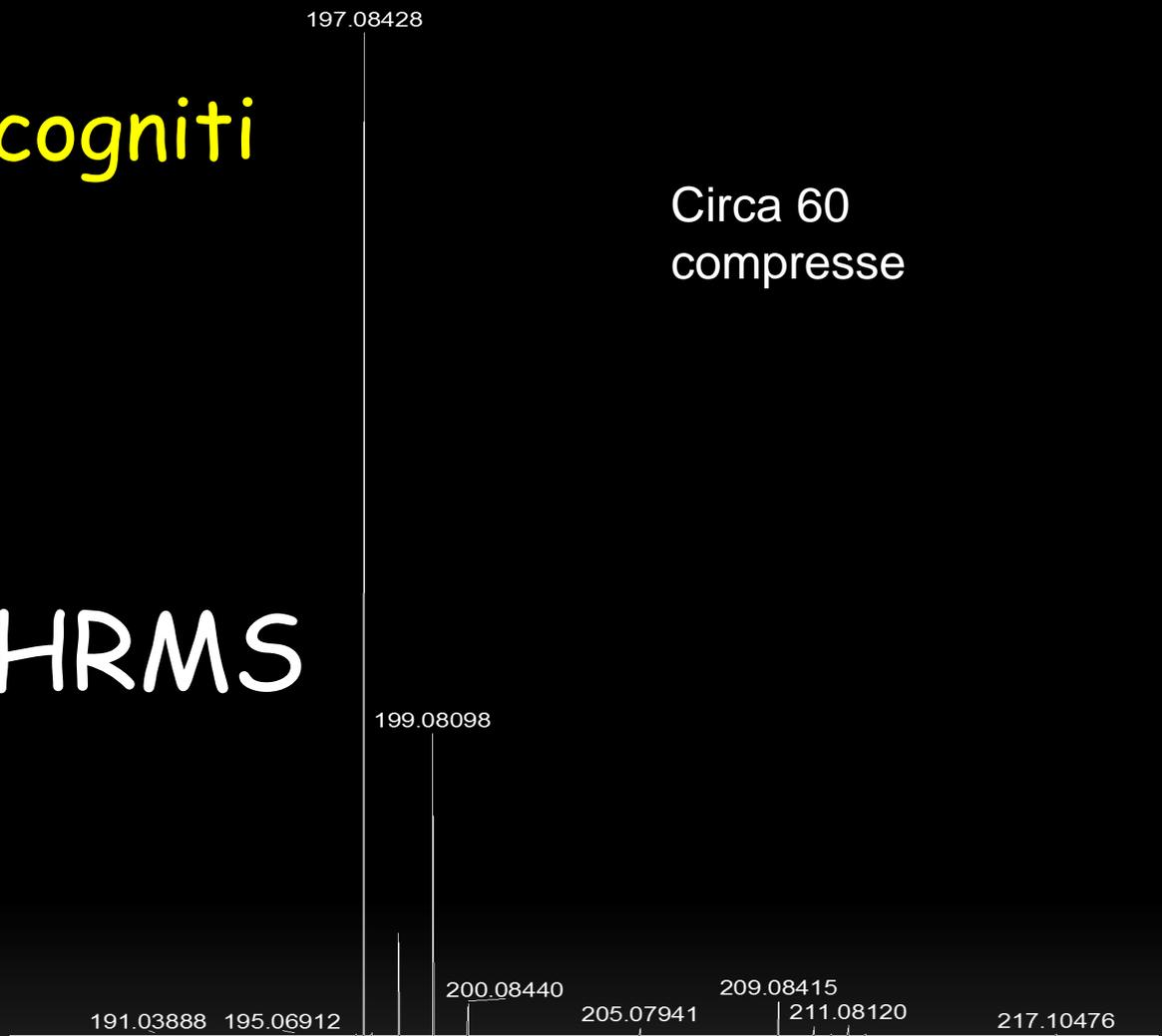
- ✓ GC o HPLC (tempo di ritenzione)
 - ✓ MS (spettro di massa)
 - ✓ GC/MS (tempo di ritenzione + spettro di massa)
 - ✓ HRMS (massa accurata) → Formula bruta (C_xH_xN_xO_x...)
 - ✓ HRMS_n → massa accurata dei frammenti
 - ✓ NMR → struttura molecolare
- 



Esempi di Reperti incogniti



HRMS



Circa 60
compresse

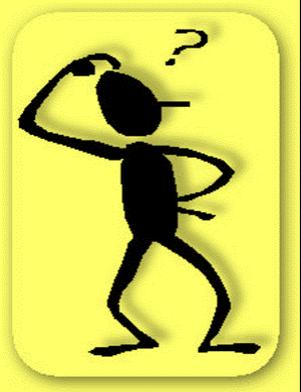
Formula bruta: $C_{10}H_{13}N_2Cl$



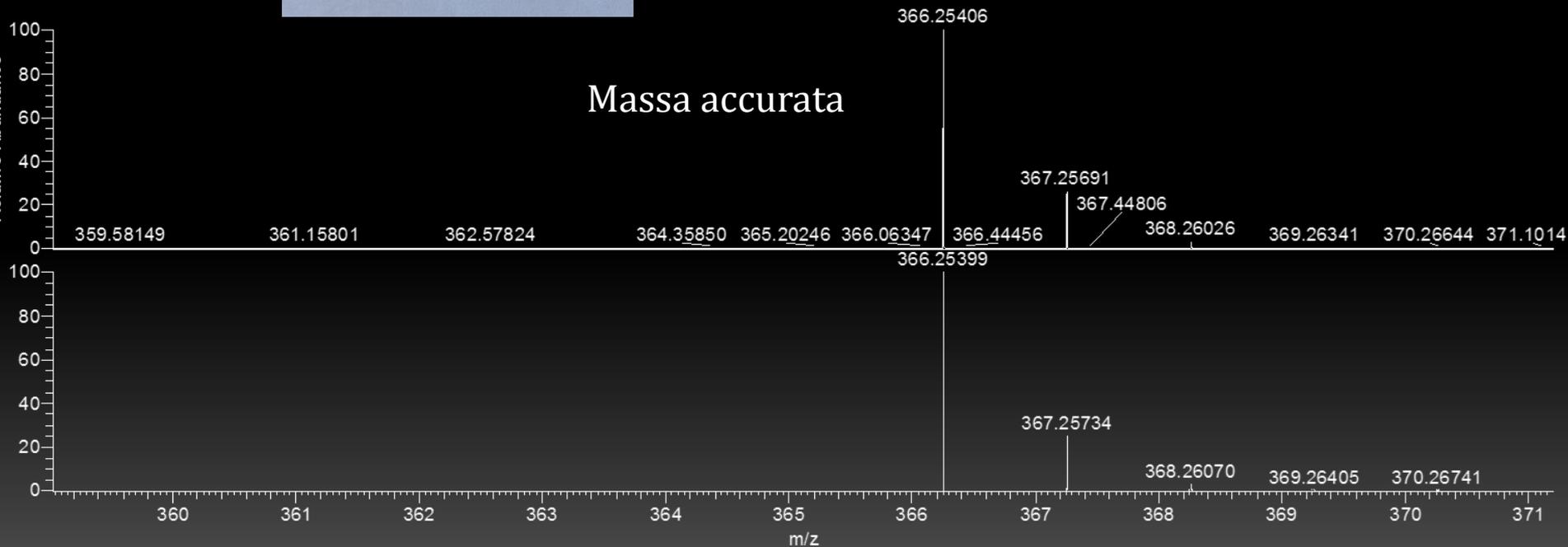
CPP



Segnalazione

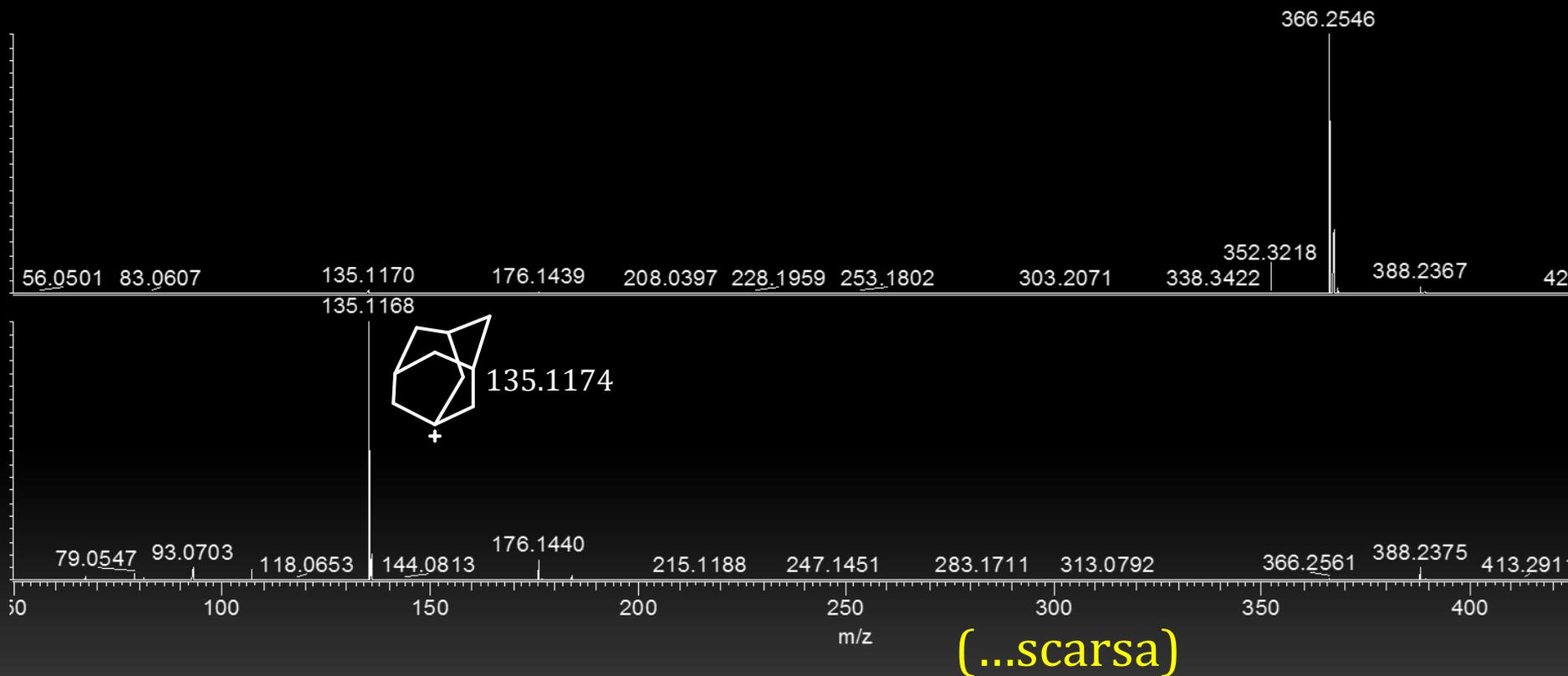


Altri Esempi di Reperti incogniti, in collaborazione con il R.I.S.

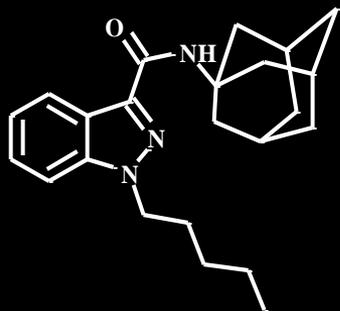
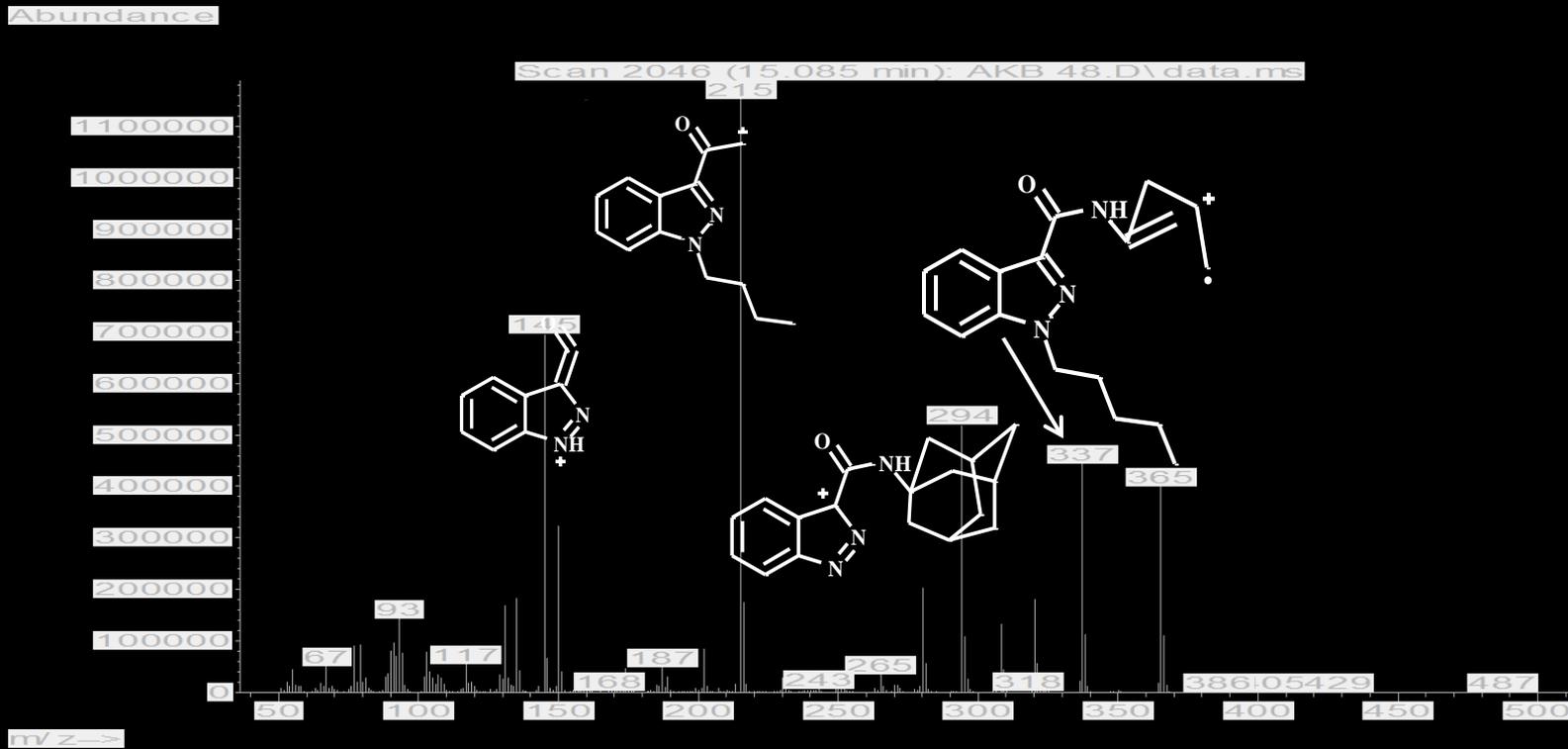


Formula bruta: $C_{23}H_{31}N_3O$

Frammentazione HRMSn



Spettro in GC-MS



M⁺ 365

+NMR

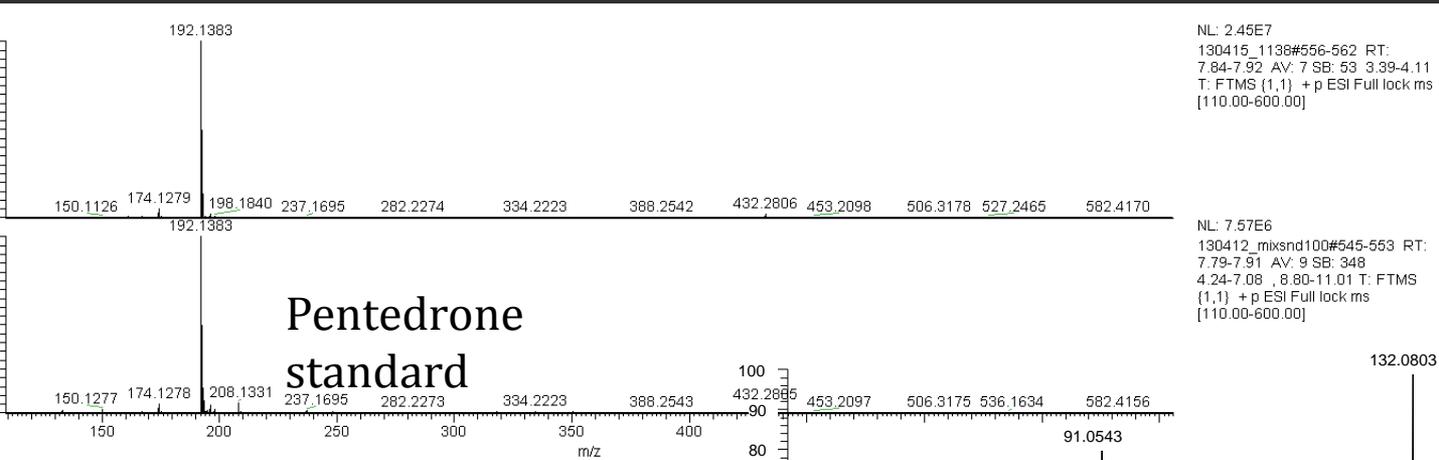


AKB48 o Apinaca



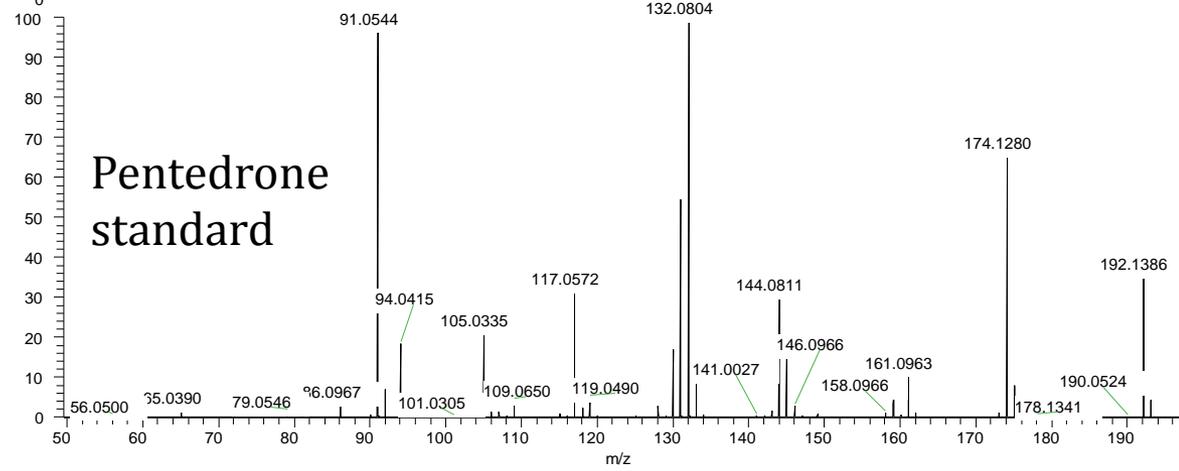
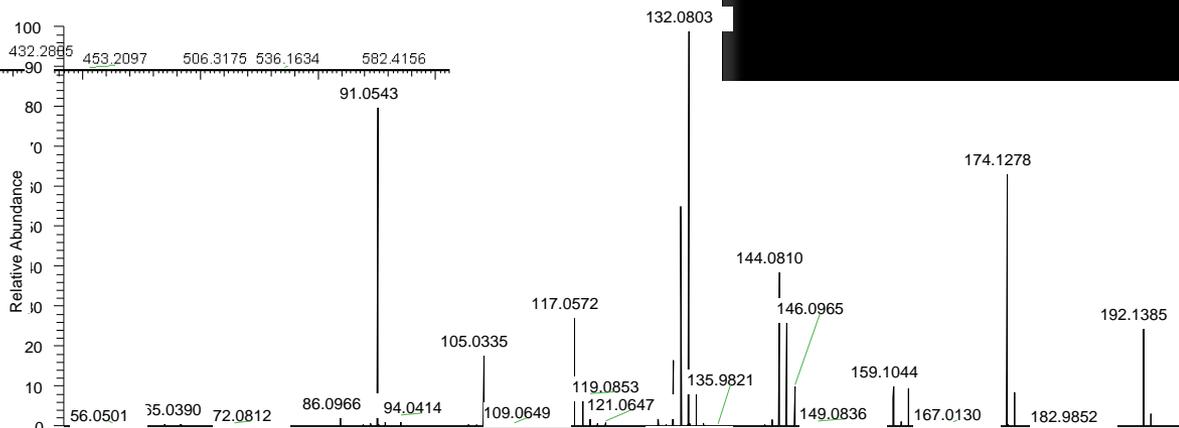
Segnalazione

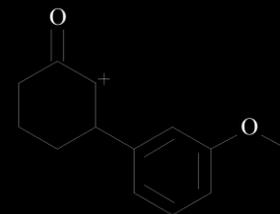
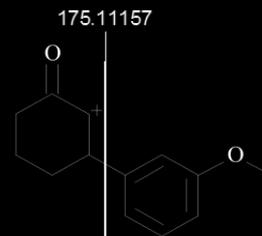
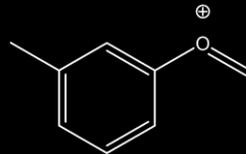
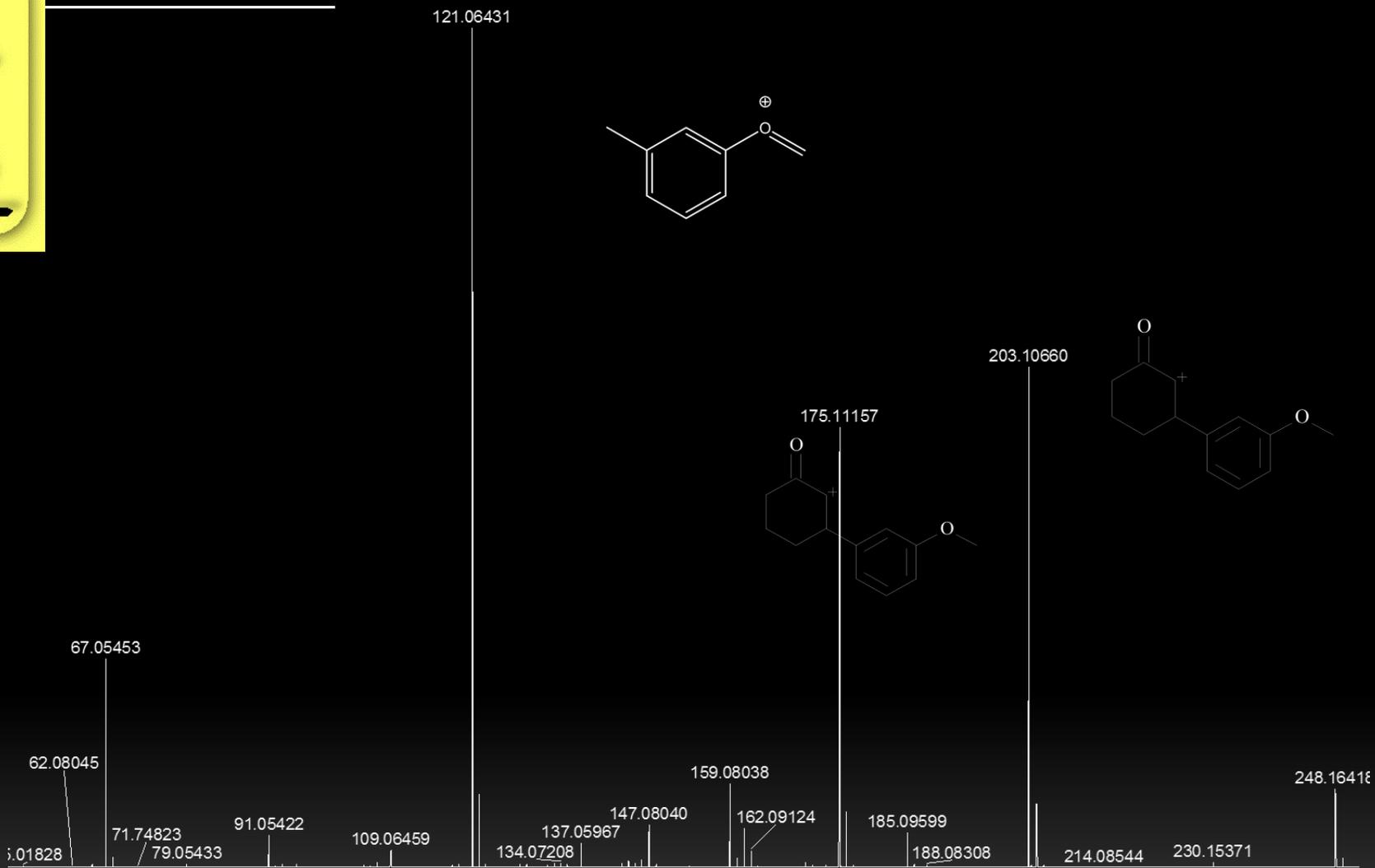
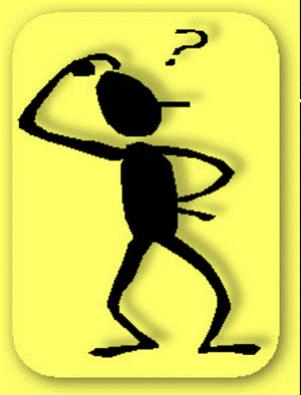
Identificazione contro standard



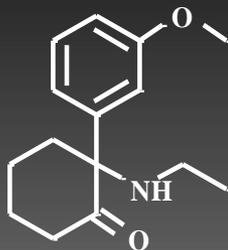
Pentedrone
standard

Formula bruta: $C_{12}H_{17}NO$
MH⁺ 192.1383

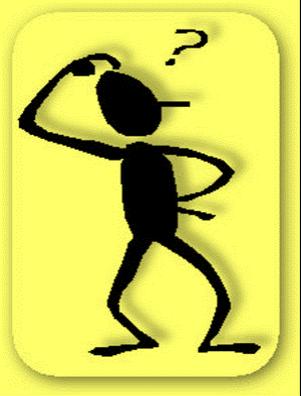




MH⁺ 248.1642 C₁₅H₂₁NO₂



methoxietamina



Benzidamina (Tantum verde, tantum rosa)

LA DENUNCIA DEI CENTRI ANTIVELENI DI MILANO-NIGUARDA E PAVIA

Bevono per sbaglio lavanda vaginale,
boom di intossicate. Sotto accusa lo spot
*Lo spot tv avrebbe tratto in inganno le consumatrici.
E ora si pensa di cambiare il colore della confezione*

...Benzydamine has been misused
recreationally. In overdosages it acts
a delirant and CNS stimulant....

Il campione biologico



▪ Sangue



▪ Parent drug + metaboliti

▪ Urine

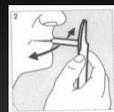


▪ **Metaboliti >> parent**

▪ Matrici alternative
(capelli, fluido orale)



▪ Parent drug (>> metaboliti)



Progetto VARD - Violence and date-rape drugs



DFSA

‘...occurs when a person (male or female) is subjected to sexual act(s) while they are incapacitated or unconscious due to the effect(s) of ethanol, a drug and/or other intoxicating substance, and as a result unable to resist or consent to such acts...’

(Costrizione ad atti sessuali non-consensuali favoriti da notevole riduzione o completa perdita di coscienza, causate dalla surrettizia somministrazione o talvolta volontaria assunzione di xenobiotici ad effetto neurodepressivo)



DFSA – sostanze incapacitanti

- ✓ GHB, GBL, 1,4-BD, valerolactone
- ✓ Benzodiazepines
 - ✓ Alprazolam, Bromazepam, Chlordiazepoxide, Clobazam, Clonazepam, Clorazepate, Clotiazepam, Cloxazolam, Diazepam, Estazolam, Flunitrazepam, Loprazolam, Lorazepam, Lormetazepam, Medazepam, Midazolam, Nitrazepam, Nordiazepam, Oxazepam, Phenazepam, Prazepam, Temazepam, Tetrazepam, Triazolam
- ✓ Z-drugs (hypnotics)
 - ✓ Zaleplon, Zolpidem, Zopiclone
- ✓ Antihistamines and others
 - ✓ Antihistamines: Brompheniramine, Cetirizine, Chlorpheniramine, Cyclobenzaprine, Diphenhydramine, Doxylamine, Hydroxyzine, Niaprazine Others: Aceprometazine, Alimemazine, Amitriptyline, Chloral hydrate, Clonidine, Clozapine, Cyamemazine, Dextromethorphan, Haloperidol, Meprobamate, New Antidepressants, Oxomemazine, Valproic acid
- ✓ Barbiturates
 - ✓ Amobarbital, Barbital, Pentobarbital, Phenobarbital, Secobarbital
- ✓ Opiates and Opioids (licit narcotic analgesics)
 - ✓ Codeine, Dihydrocodeine, Hydromorphone, Methadone, Morphine, Oxycodone
- ✓ Street drugs and traditional drugs of abuse
 - ✓ Cannabinoids: THC, **Synthetic cannabinomimetics**
 - ✓ Opiates: Heroin, Morphine
 - ✓ Cocaine: Cocaine and crack cocaine
 - ✓ Amphetamines: Amphetamine, PMA, MBDB, MDA, MDEA, MDMA, Methamphetamine
- ✓ Others
 - ✓ Atropine, Ayahuasca, **Cathinone and cathinon derivatives**, Hallucinogenic mushrooms,
 - ✓ Kawa-kawa, Ketamine, LSD, Mescaline, Phencyclidine, **Piperazine group**, Poppers, Salvinorine A,
 - ✓ Scopolamine
- ✓ Ethanol

Rape Drugs are out there.



Are they in here?

Il campione biologico



- ✓ **L'urina è la matrice biologica di prima scelta nell'analisi delle sostanze incapacitanti e d'abuso**
- ✓ Nel caso in cui i fatti siano molto antecedenti al prelievo: capelli
 - ✓ Aspettare almeno tre settimane.
 - ✓ Effettuare il prelievo in modo da distinguere la sezione prossimale



Finestre temporali di rilevabilità

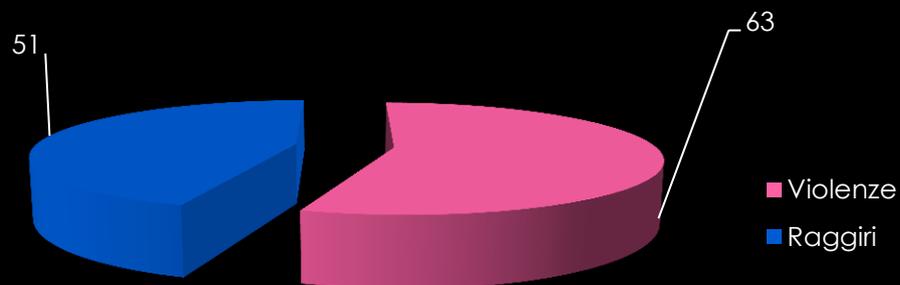
Zolpidem metaboliti



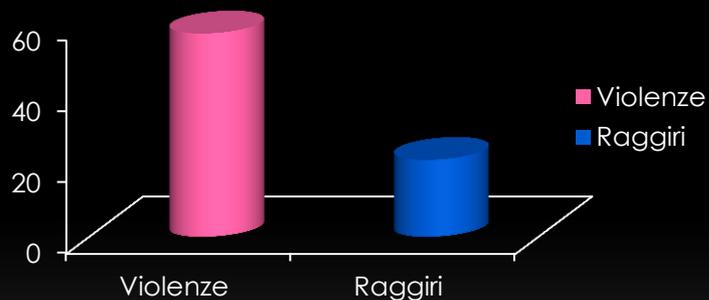
UHPLC-MS/MS and UHPLC-HRMS identification of zolpidem and zopiclone main urinary metabolites and method development for their toxicological determination. S. Strano-Rossi, et al. *Drug Test. Anal.* 2013 Mar 19. doi: 10.1002/dta.1470.

Risultati: 80 soggetti, 49 violenze, 31 raggiri

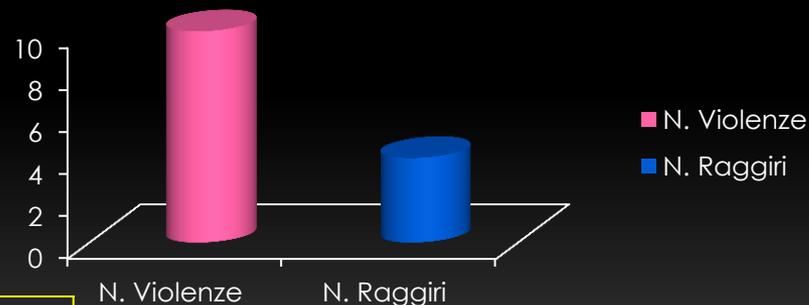
% Positività generale



% Positività per alcol



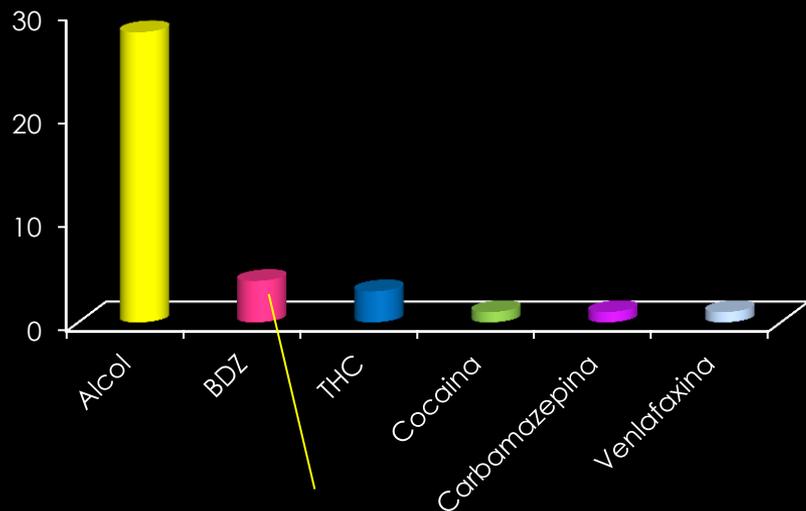
alcol+ altre sost



2 + BDZ
1 + Z
3 + THC
2 + coca
1 + carbamazepina
1 + venlafaxina

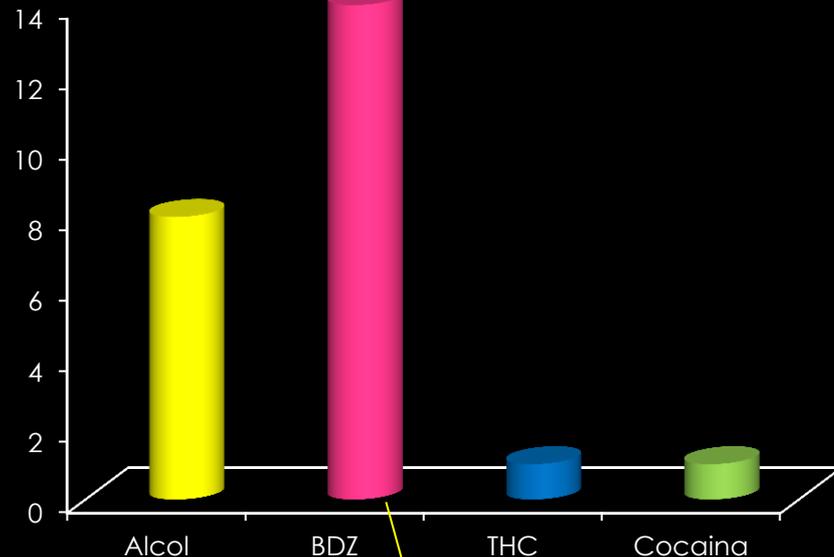
3 + BDZ
1 + THC

Sostanze rilevate nelle violenze



Temazepam + Nordiazepam + Oxazepam + Zolpidem e metaboliti
Clonazepam e 7NHClonaz + Lorazepam
Lorazepam + Delorazepam
Zolpidem e metab + Clonazepam e 7NHClonaz

Sostanze rilevate nei raggiri



2 casi lorazepam
7 casi di Clonazepam e/o 7NHClonaz
Lorazepam + Delorazepam
2 casi Zolpidem e metab
Bromazepam
Triazolam + metab

Come studiare il metabolismo?

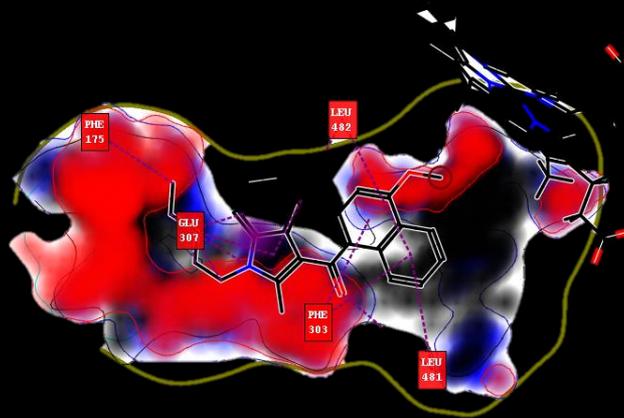
- Studi umani  (problemi etici)
- Studi su animali (problemi logistici ed etici)
- **Studi *In vitro* (utilizzando colture cellulari, frazioni microsomiali epatiche, enzimi ricombinanti)**



- **Studi *In silico* (predicendo tramite software i metaboliti e identificandoli in dati sperimentali)**

Studi *In silico*

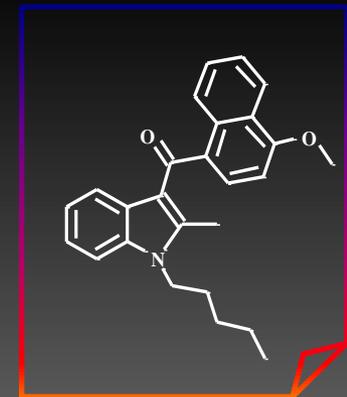
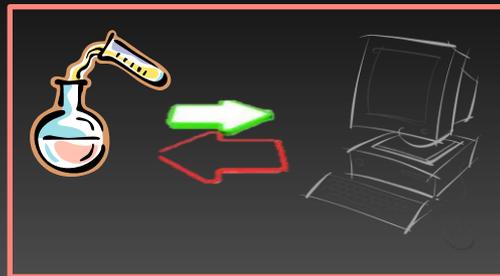
- **MetaSite** è un programma software che predice le biotrasformazioni metaboliche di fase I mediate dal citocromo P450.



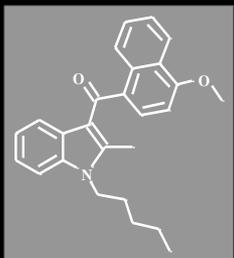
Il software attribuisce i più probabili siti di metabolismo (SoM), basandosi sulla sua struttura molecolare (sulla reattività dei siti), sulla sua possibile interazione con l'enzima (sull'ingombro sterico), e predice i principali metaboliti che possono quindi formarsi in diversi tessuti (fegato, pelle, cervello, polmoni).

Combinazione studi *in vitro*/*in silico* per l'interpretazione di datafiles in MS/MS

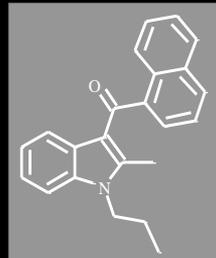
- **Mass-MetaSite** è un nuovo approccio per l'identificazione automatica dei metaboliti da datafiles di Cromatografia Liquida - Spettrometria di massa, riducendo i tempi di analisi manuale da varie ore a pochi minuti per composto. Il programma è in grado di assegnare le strutture chimiche ad ogni picco cromatografico rilevato, basandosi sulla massa accurata e sulla frammentazione ottenuta in MS/MS della molecola substrato e dei metaboliti



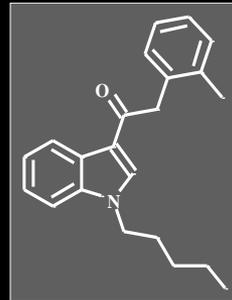
Studio Pilota



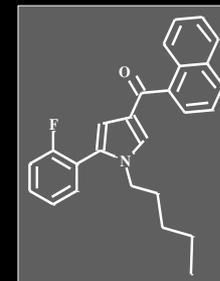
JWH-098



JWH-015

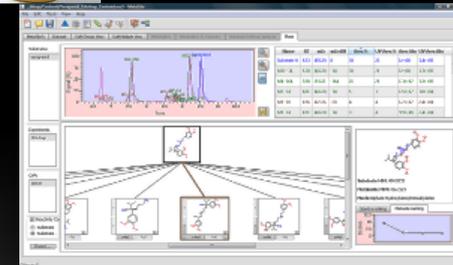


JWH-251



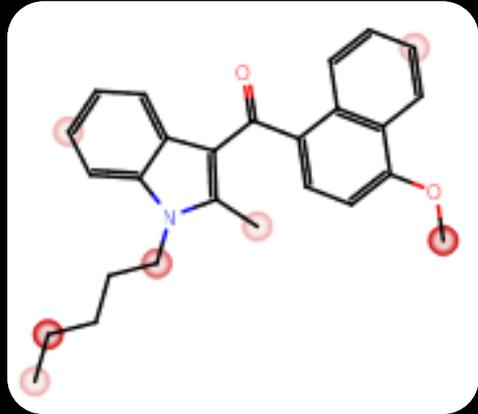
JWH-307

- ✓ Studiare metabolismo in vitro (su fettine di fegato di ratto)
- ✓ Analisi in HR con QTOF
- ✓ Uso MassMetaSite per una rapida elucidazione degli spettri ed attribuzione delle strutture dei metaboliti



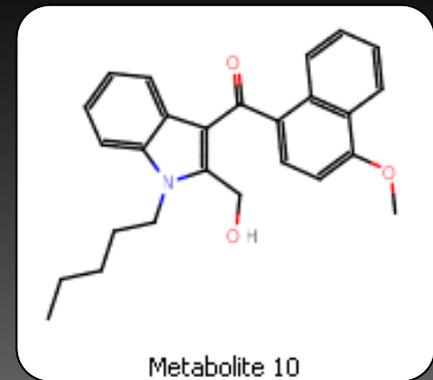
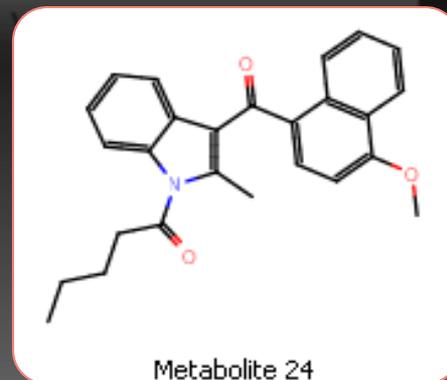
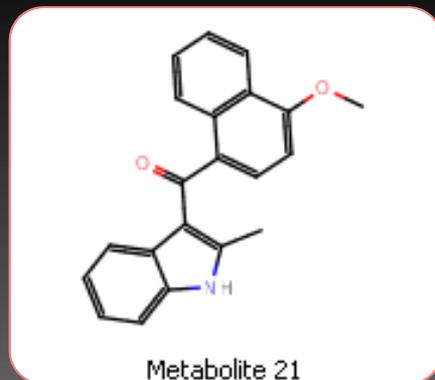
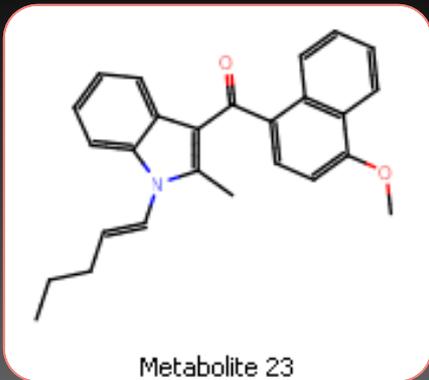
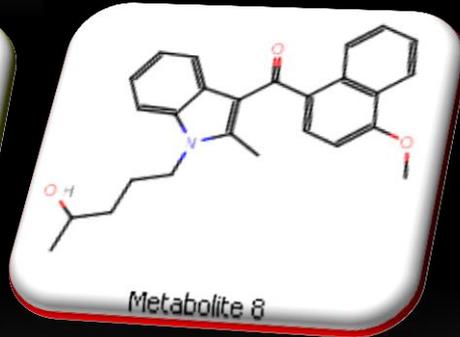
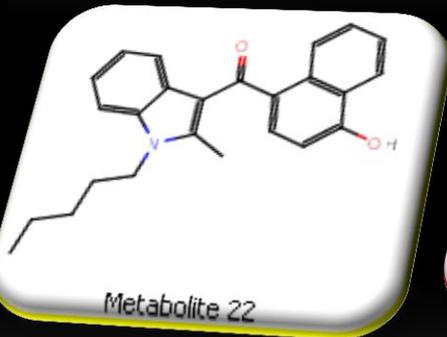
- ✓ Valutare la concordanza tra la predizione teorica ed i metaboliti rilevati
- ✓ Sviluppo di metodi per la ricerca dei corretti metaboliti nei campioni biologici

Es: JWH 098

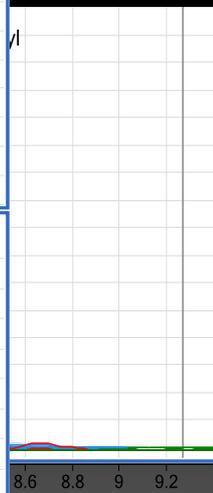
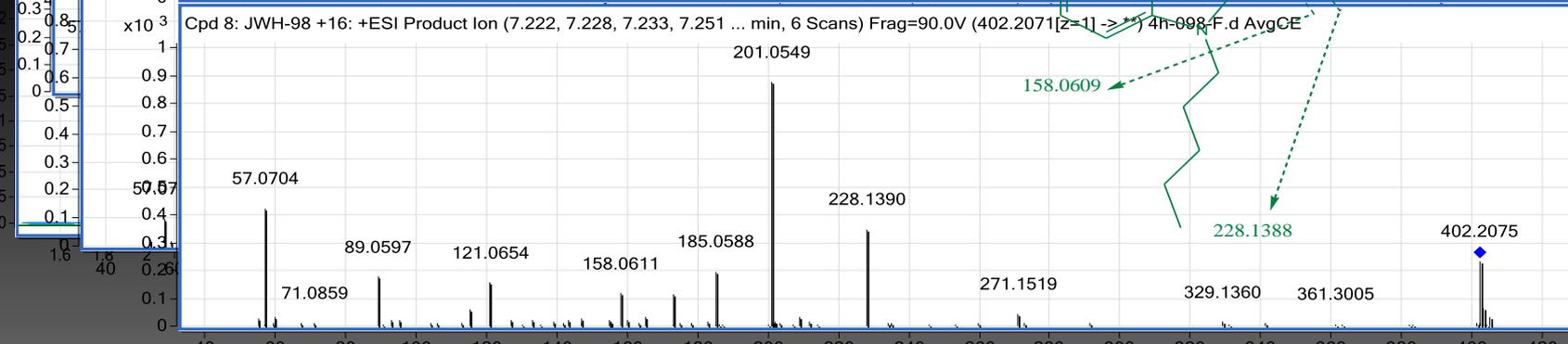
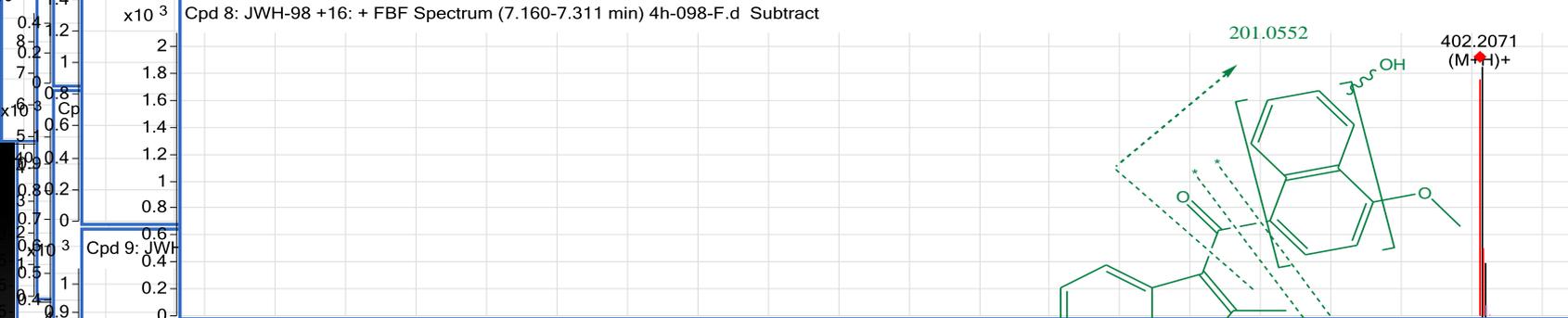
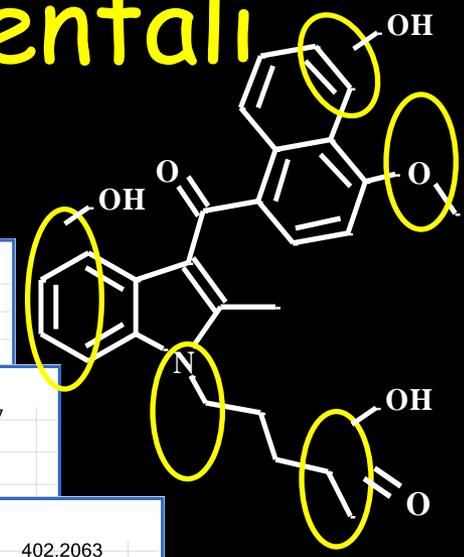


Siti più probabili di metabolismo

...e **principali metaboliti** predetti



JWH098: risultati sperimentali



CONCLUSIONI

Esempi di attività di ricerca di un centro collaborativo del sistema di allerta rapida sulle droghe

- ✓ Possibilità di identificare con certezza le nuove sostanze psicoattive nei reperti non biologici tramite strumenti estremamente sofisticati, ma anche con l'ausilio di strumentazioni "classiche"
- ✓ *Possibilità di identificare le NSP nei fluidi biologici, anche se metabolizzate, grazie anche a studi di predizione dei metaboliti In silico e la successiva identificazione dei metaboliti tramite software ad hoc (MassMetaSite)*

...passi avanti nella lotta all'avvento sul mercato clandestino di nuove sostanze





Grazie

- Dipartimento Politiche Antidroga
- Prof. Marcello Chiarotti
- Prof. Vincenzo Pascali
- Luca Anzillotti, Sara Odoardi, Erika Castrignanò
- **A tutti voi per l'attenzione!**