



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**DSS**

Dipartimento di  
Scienze della Salute

**URITON**

**UNITÀ DI RICERCA ED INNOVAZIONE IN TOSSICOLOGIA FORENSE  
E NEUROSCIENZE DELLE DIPENDENZE E NUOVE DROGHE**

*Delibera Consiglio DSS 22/08/2015 Verb. n. 7/2015*

# **Simposio “Addiction” e Identificazione di Nuove Sostanze Psicoattive**

Firenze, 6 aprile 2016

Aula Magna NIC pad. 3 didattica, largo Brambilla 3, Firenze



# NSP

## NUOVE MOLECOLE IDENTIFICATE

Dott. Fabio Vaiano, Dott.ssa Valeria Catalani

U.R.I.To.N.

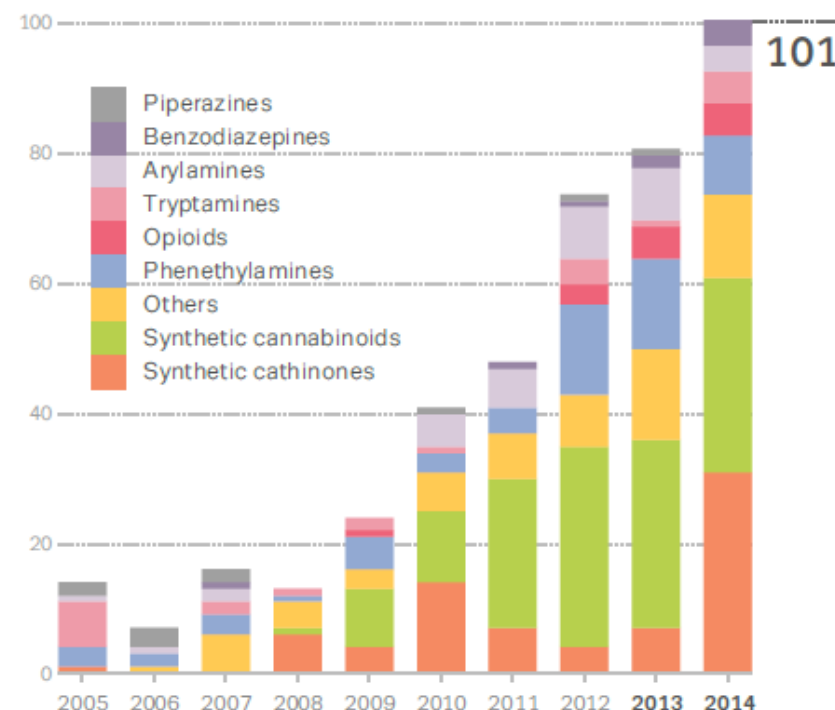
Struttura di Tossicologia Forense - Dipartimento di Scienze della  
Salute Università di Firenze



Il continuo aumento delle NSP sul mercato illecito delle sostanze stupefacenti rappresenta una vera e propria **sfida analitica**

Le Strutture di Tossicologia, sia cliniche che forensi, sono spinte allo **sviluppo** di **metodi rapidi, specifici e sensibili** per la loro rilevazione

Number of new psychoactive substances reported to the EU Early Warning System, 2005–14





La nostra Unità di Tossicologia Forense è da sempre **focalizzata** sul problema delle NSP

Diversi casi di identificazione delle NSP sono stati registrati negli ultimi anni e prontamente segnalati al programma National Early Warning System del Dipartimento Politiche Antidroge



La nostra strategia:

- Attuazione di una sistema analitico ad ampio spettro
- Messa a punto di **procedure analitiche** più sensibili e per un ampio numero di composti
- Creazione di un' Unità di Ricerca e Innovazione in Tossicologia Forense e Neuroscienze delle Dipendenze (U.R.I.To.N.)



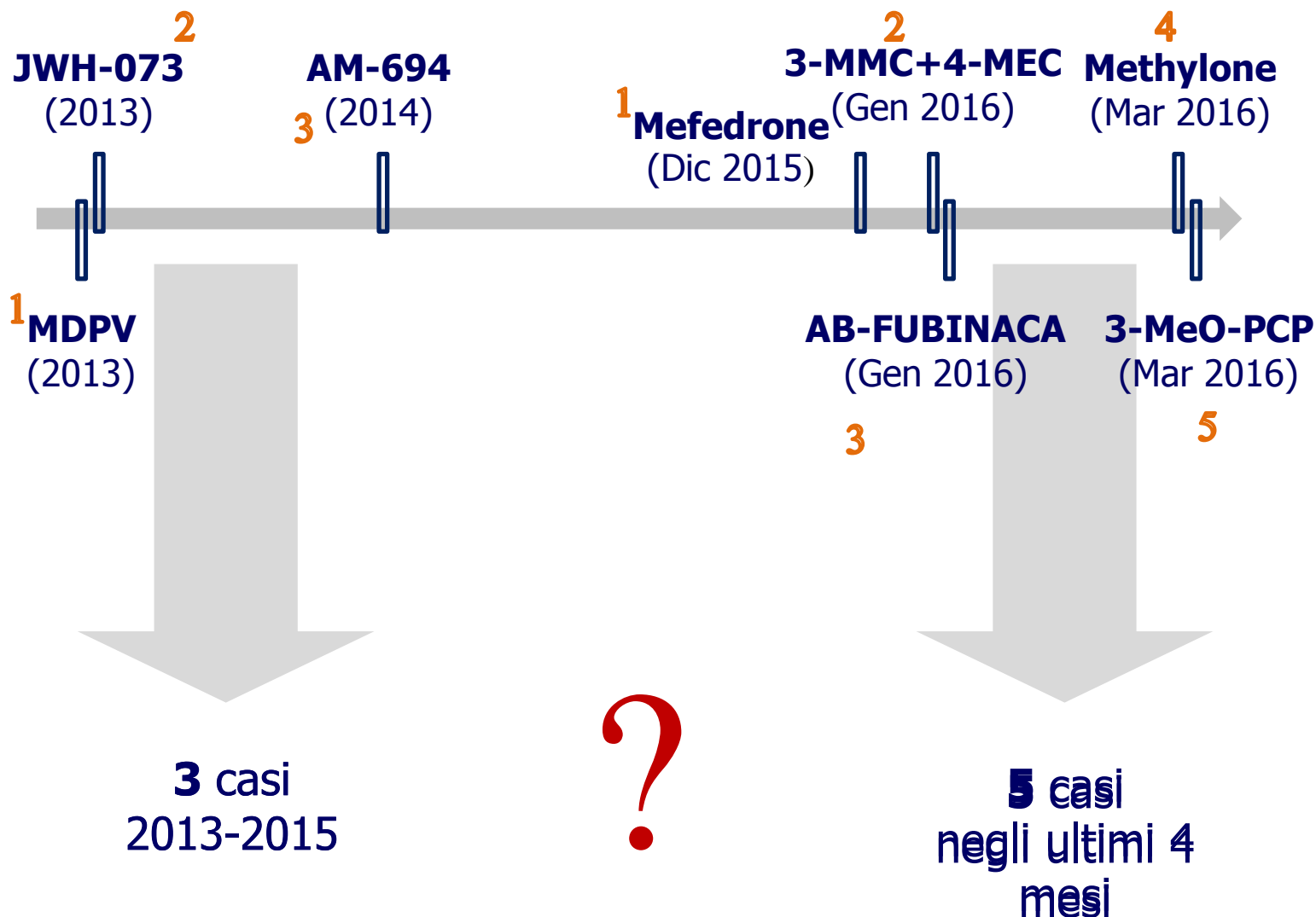
## **NSP identificate in materiale sequestrato:**

- **3-MMC** (*catinone sint.*) 97.98 g di polvere bianca
- **4-FA** (*fenetilamina*) 0.93 g di polvere bianca
- **Pentedrone** (*catinone sint.*) 0.91 g di polvere bianca
- **Pentedrone + 3-MMC** 3.76 g di polvere bianca
- **Metossietamina** (*analogo ketamina*) 0.13 g di polvere bianca
- **AB-FUBINACA** (*cannabinoide sint.*) 2.5 g di materiale vegetale
- **5-MAPB** (*fenetilamina*) 19 bustine di carta (polvere bianca)
- **5-MAPB** 3 capsule arancioni (polvere bianca)
- **bk-2C-B** (*catinone sint.*) 1 capsula arancione (polvere giallognola)
- **bk-2C-B + nuovo composto** 1 capsula blu (polvere grigio /rossa)



## NSP identificate in campioni biologici:

- <b>JWH-073</b> ( <i>cannabinoide sint.</i> )	Sangue	Urine	
- <b>MDPV</b> ( <i>catinone sint.</i> )		Urine	
- <b>AM-694</b> ( <i>cannabinoide sint.</i> )		Urine	
Post-mortem → - <b>Mefedrone</b> ( <i>catinone sint.</i> )	Sangue		
- <b>AB-FUBINACA</b> ( <i>cannabinoide sint.</i> )	Sangue	Urine	
- <b>3-MMC + 4-MEC</b> ( <i>catinone sint.</i> )	Sangue	Urine	
Post-mortem → - <b>Metilone</b> ( <i>catinone sint.</i> )	Sangue	Urine	Encefalo
- <b>3-MeO-PCP</b> ( <i>derivato fenciclidina</i> )	Sangue	Urine	







**JWH-073**  
(2013)

**AM-694**  
(2014)

**Mefedrone**  
(Dic 2015)

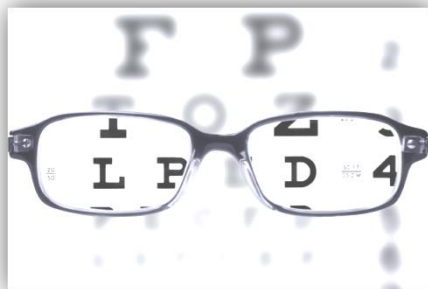
**3-MMC+4-MEC**  
(Gen 2016)

**Metilone**  
(Mar 2016)

**MDPV**  
(2013)

**AB-FUBINACA**  
(Gen 2016)

**3-MeO-PCP**  
(Mar 2016)



Un nuovo metodo di screening **in LC-MS/MS** è stato messo a punto, validato e utilizzato in analisi di routine per la ricerca e identificazione simultanea di **69 composti**  
(Set 2015)





## 28 Cannabinoidi sint.

*AB-FUBINACA, 5F-APINACA, ADB-PINACA, CB-13, WIN 55,212-2, 2 RCS serie, 17 JWH serie, 3 AM serie, Pravadoline*

## 19 Catinoni sint.

*1-nafirone, 2-FMC, 3,4-DMMC, 3-MMC, 4-FMC, 4-MEC, Bufedrone, Butiolne, DMC, Etcatinone, MDPV, Mefedrone, Metcatinone, Metedrone, Metilone, Nafirone, Pentedrone, Etilone, Pentilone.*

## 5 fenetilamine

*25D-NBOMe, 25H-NBOMe, 2C-E, 2C-N, 4-FA*

## 5 amfetamine

*Amfetamine, MDA, MDEA, MDMA, Metamfetamine*

## 3 indani

*2-AI, 5-IAI, MDAI*

## ketamine

*Ketamina, Nor-ketamina, Metossietamina*

## 2 piperazine

*BZP, m-CPP*

## 2 fenciclidine

*3-MeO-PCP, 4-MeO-PCP*

## 2 triptamine

*4-OH-DiPT, 5-MeO-DiPT*





## CASO 1:

**Età:** 17 anni

**Sesso:** Maschio

**Sintomi:** Allucinazioni, agitazione psicomotoria, miosi e midriasi

**Trattamento:** Midazolam

**Gli amici hanno dichiarato:** “**Ha bevuto molto** , ma non sappiamo se ha preso qualcosa”

**Lui ha dichiarato:** “**Non ricordo nulla**”

Al ricovero sono state condotte le analisi di routine su sangue e urine:

- Tasso alcolemico nel sangue: **2.60** g/L
- Screening test urine: **POS** per cannabinoidi

Urine e sangue sono stati mandati alla nostra Unità per ulteriori analisi



## Test immunoenzimatico di screening sulle urine (EMIT):

**POS** benzodiazepine e cannabinoidi  
**NEG** oppiacei, cocaina, metadone, barbiturici

**Midazolam** e il suo **metabolita** ( $\alpha$ -idrossimidazolam) sono stati identificati sia nel sangue che nelle urine

### **Analisi Cannabinoidi:**

Campioni sangue e urina



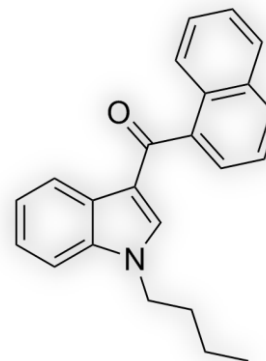
Idrolisi Basica



SPE



GC-MS  
(SIM)



**JWH-073**

Composto	Sangue ng/mL	Urina ng/mL
THC-COOH	55	1080
<b>JWH-073</b>	2.78	0.1



## CASO 2:

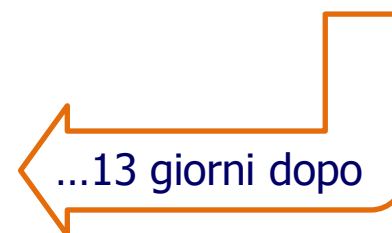
**Età:** 27 anni  
**Sesso:** Maschio

**Sintomi:** Glasgow coma (punteggio 9)

**Dichiara:** Iniezione endovena di dosi multiple di  
**MDPV**  
Uso di **benzodiazepine** per contastare  
l'insonnia perenne

**Sintomi:** Elevata agitazione, strano  
comportamento e tendenze suicide

**Dichiara:** Agitazione, **delirio**, **allucinazioni**  
visive, tattili e uditive



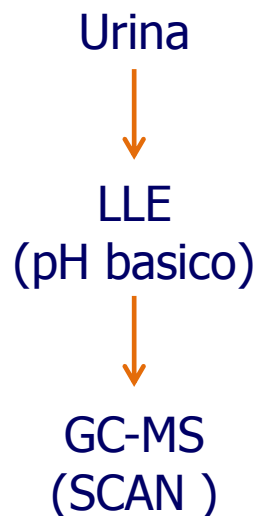
**Rifiutò analisi** del **sangue** e dei **capelli** e l'assistenza psichiatrica



EMIT:     **POS** per benzodiazepine  
NEG per oppiacei, cannabinoidi, cocaina, metadone, barbiturici  
amfetamines, MDMA

Analisi quantitativa per le Benzodiazepine in LC-MS/MS :  
Alprazolam, Clordiazepossido, Diazepam e metaboliti

### Analisi generica in GC-MS :

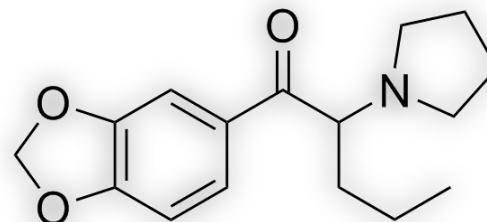


POS per **MDPV**  
(*Metilendossipirovalerone*)

### Analisi quantitativa in GC-MS :

↓

1 <sup>st</sup> ricovero:	<b>55.7</b> ng/mL
2 <sup>nd</sup> ricovero:	<b>35.4</b> ng/mL

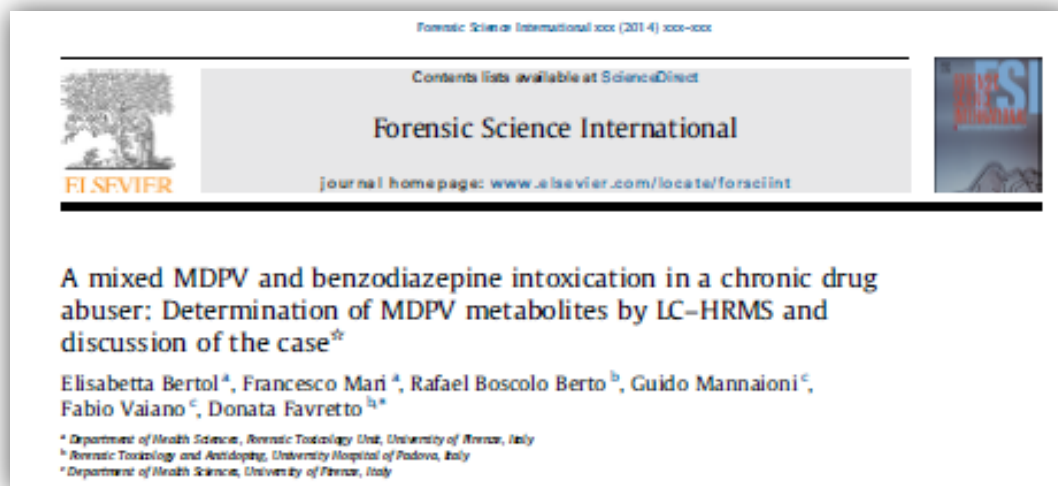




## Identificazione dei metaboliti del MDPV :

Le urine sono state analizzate tramite un LC-HRMS (Orbitrap)

Demetilenil-MDPV-glucuronide;  
Demetilenil-metil-MDPV-glucuronide isomero 1;  
Demetilenil-metil-MDPV-glucuronide isomero 2;  
Demetilenil-metil-osso-MDPV-glucuronide;  
Demetilenil-metil-idrossi-MDPV-glucuronide;  
Demetilenil-osso-MDPV-glucuronide;





## **Storia self-report di abuso :**

- Ha usato cocaina e amfetamine dal 2009 al 2011
- E' passato al MDPV e/o metilmetcatinone e/o pentedrone
- Solitamente compra 10 g MDPV su Internet, una polvere superfina con purezza indicata del 99%
- All'inizio, dissolveva 10 mg di polvere in 1-2 mL di acqua (distillata o pubblica), somministrandosela endovena
- Ha aumentato la dose iniettata fino a 150 mg, con un aumento del craving che lo portava a ripeterne l'assunzione ogni 6-7 h, richiedendo un punto di iniezione permanente nella vena
- Insieme al MDPV non consuma altre sostanze illecite





## CASO 3:

**Età :** 25 anni

**Sesso:** Maschio

**Sintomi:** Portato in ospedale dopo un grave trauma.  
**Agitazione, allucinazioni, ansia e paranoia.**

**Trattamento:** Midazolam.

**Dichiara:** Consumo di **alcol** e di una **pillola sconosciuta**

<b>Campioni prelevati:</b>	<b>Sangue:</b>	<b>9 h</b> dopo il ricovero
	<b>Urina:</b>	<b>6 h</b> dopo il ricovero

Tasso alcolemico nel sangue: **0.015 g/L**



EMIT:     **POS** per benzodiazepine  
              NEG per oppiacei, cannabinoidi, cocaina, metadone, barbiturici

Analisi quantitativa per le Benzodiazepine in LC-MS/MS :  
              **Midazolam** e metaboliti

Analisi generica in GC-MS:

**NEG** per le classiche droghe d'abuso



Abbiamo deciso di utilizzare due **metodiche all'epoca sperimentali**  
in LC-MS/MS:

- **23** cannabinoidi sintetici
- **16** catinoni sintetici



## Catinoni sintetici:

Sangue e urina



LLE  
(pH basico)



LC-MS/MS  
(MRM )

**NEG**

1-nafirone  
3,4-dimetilmetcatinone  
4-fluorometcatinone  
4-metiletcatinone  
Bufedrone  
Butilone  
Dimetilcatinone  
Etcatinone  
Etilone  
Metcatinone  
MDPV  
Metedrone  
Metilone  
Nafirone  
Pentedrone  
Pentilone

## Cannabinoidi sintetici:

Sangue e urina



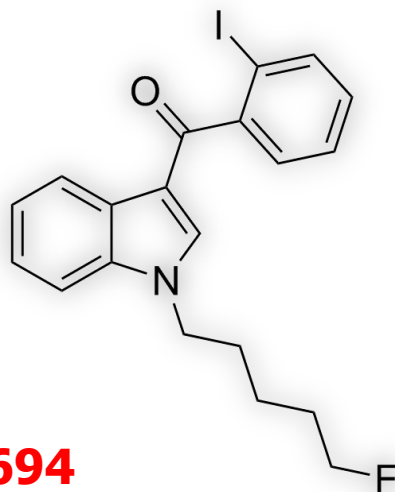
SPE



LC-MS/MS  
(MRM mode)

**Urina**  
**POS per AM-694**

AM-2201	JWH-147
AM-2233	JWH-200
AM-694	JWH-203
CB-13	JWH-210
JWH-007	JWH-250
JWH-016	JWH-251
JWH-018	JWH-302
JWH-019	JWH-307
JWH-073	JWH-398
JWH-081	RCS-4
JWH-098	RCS-8
JWH-122	



**AM-694**

### AM-694 metaboliti:

Urina



Idrolisi  
(pH acido)



LLE  
(pH basico)

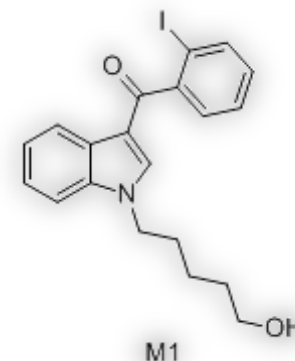


LC-MS/MS  
(SIM)

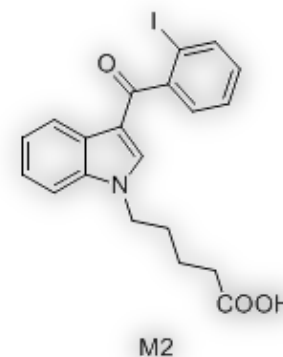


AM-694

Metabolita defluorato (M1)  
Metabolita carbossilato (M2)



M1



M2

Composto	Urina ng/mL
AM-694	0.084



Forensic Science International 256 (2015) 21–27



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

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



## *In vivo* detection of the new psychoactive substance AM-694 and its metabolites



Elisabetta Bertol<sup>\*</sup>, Fabio Vaiano, Maria Grazia Di Milia, Francesco Mari

*Department of Health Science, Forensic Toxicology Division, University of Florence, Florence, Italy*

**Primo caso in letteratura di identificazione e quantizzazione del AM-694 come parent compound** nelle urine, insieme a due metaboliti



**Nonostante la diffusione delle NSP apparisse allarmante,  
i casi documentati nei fluidi biologici sembravano essere pochi.**

**Oggi appare evidente che tutto ciò fosse dovuto**

***alla MANCANZA***

**di protocolli analitici di routine per la ricerca di queste sostanze e**

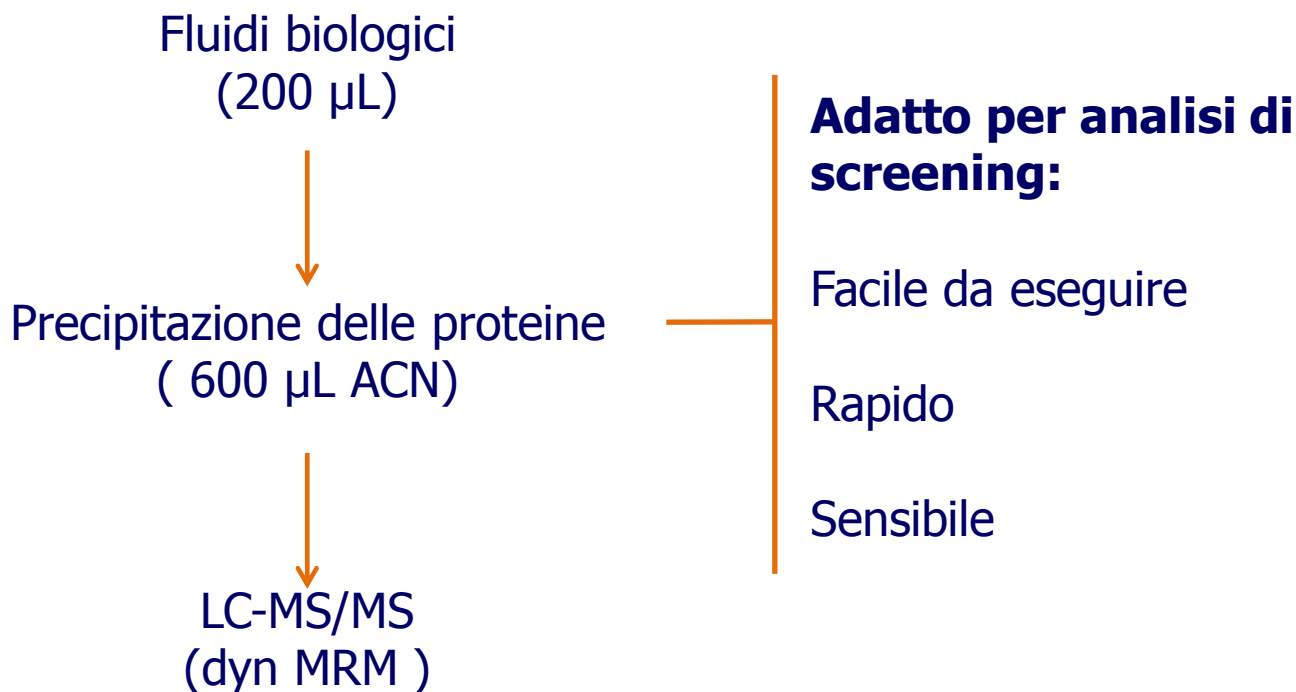
***NON***

**alla loro esigua presenza sul mercato**



# **NUOVO METODO DI SCREENING PER LA RILEVAZIONE SIMULTANEA DI 69 COMPOSTI TRAMITE UNA SINGOLA CORSA IN LC-MS/MS**

## **Procedura**

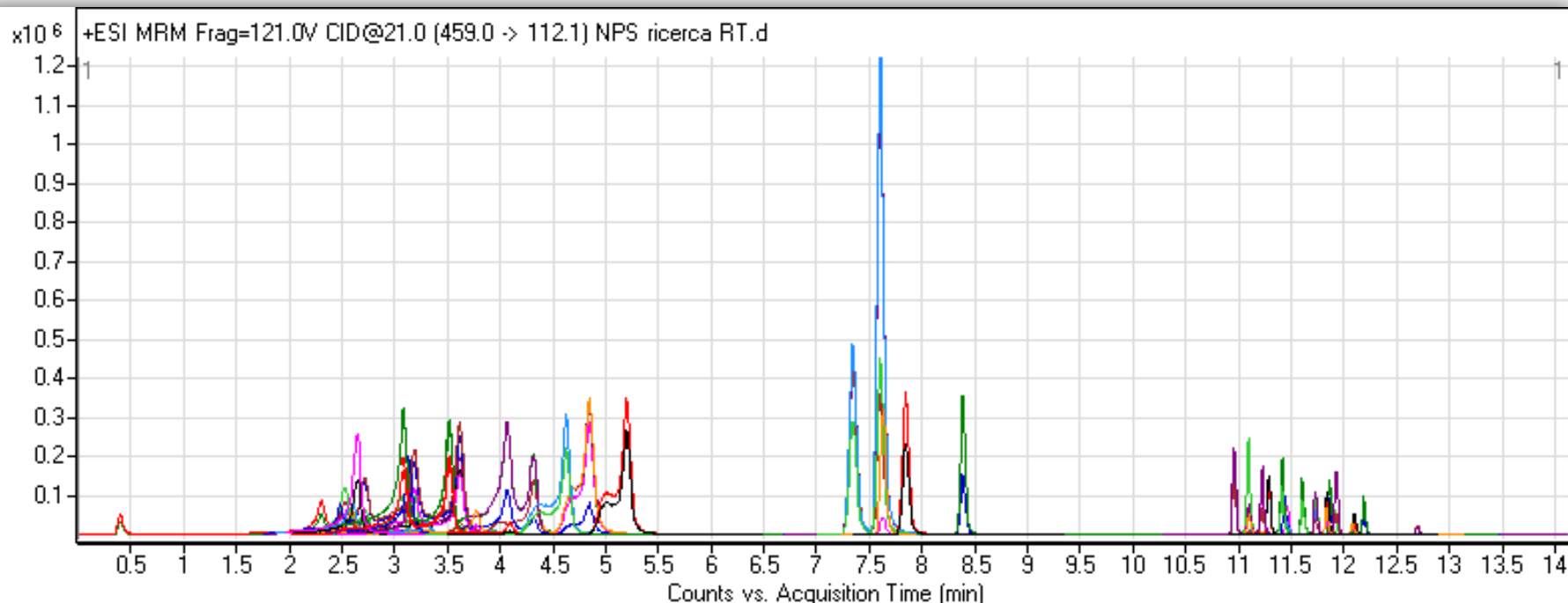






**Il Dynamic Multiple Reaction Monitoring** permette di monitorare le transizioni all'interno di una specifica finestra temporale attorno al tempo di ritenzione atteso per ogni composto

**Il rumore di fondo e l'effetto matrice sono minimizzati aumentando in questo modo la sensibilità del metodo**





## CASO 4:

**Età:** 23 anni

**Sesso:** Femmina

**Ritrovamento:** Il cadavere è stato trovato nel bagno di un club

Non ci sono altre informazioni

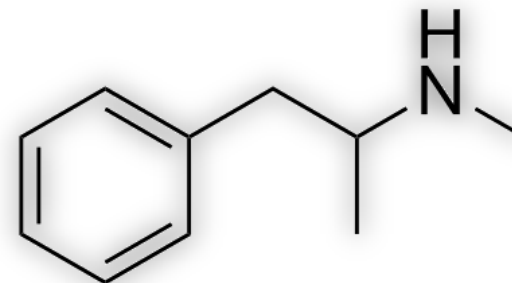
**Campioni:** Sangue periferico

Sangue inviato alla nostra Unità per ulteriori analisi



## Analisi generica in GC-MS:

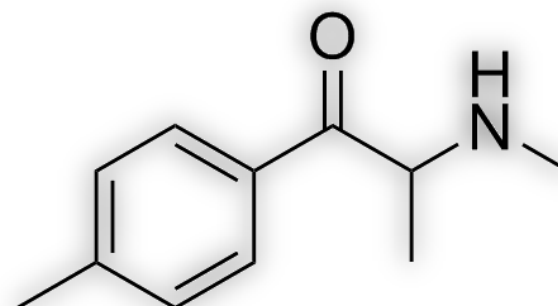
**POS** per metamfetamine



**metamfetamine**

## Analisi in LC-MS/MS :

Composto	Sangue ng/mL
Metamfetamine	315.2
Mefedrone	20.1



**Mefedrone(catinone sint.)**



## CASO 5:

**Età:** 16 anni

**Genere:** Femmina

**Sintomi:** Portata in ospedale dopo essere collassata due volte a scuola. **Allucinazioni visive** ed **uditive, tremori periferici**

**Dichiara:** Fumato “erba sintetica”

Sangue ed urina sono stati mandati alla nostra Unità di Tossicologia Forense



EMIT: **POS** per cannabinoidi  
NEG per oppiacei, benzodiazepine, cocaina, metadone,  
barbiturici

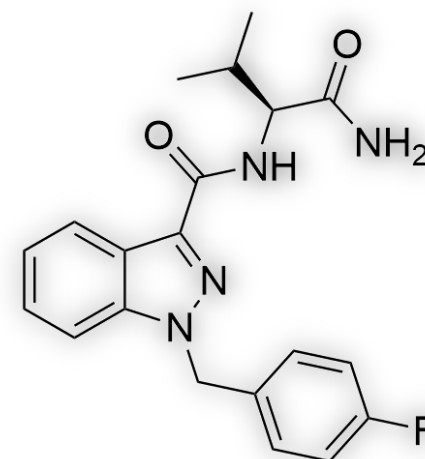
Analisi per i cannabinoidi GC-MS:

Composto	Urina ng/mL
THC-COOH	9.81

Analisi LC-MS/MS:

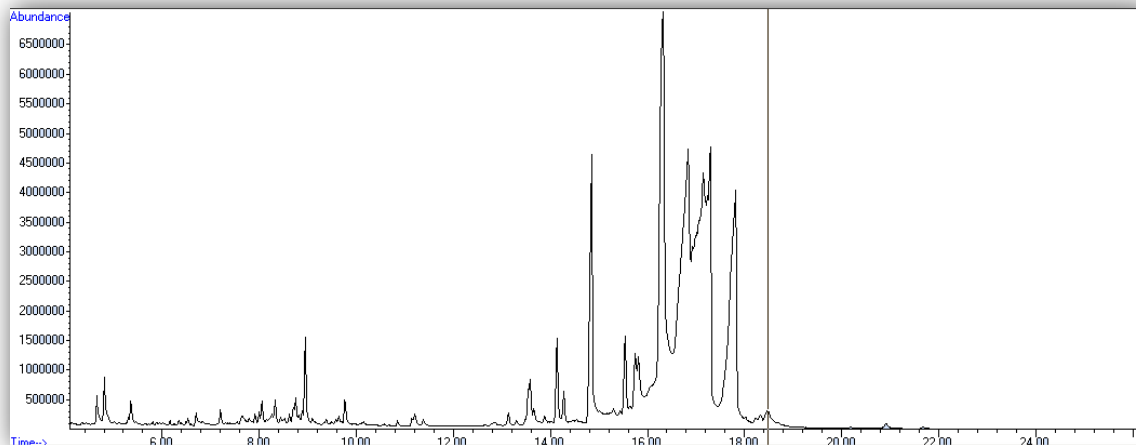
Composto	Sangue ng/mL	Urina ng/mL
<b>AB-FUBINACA</b>	4.56	0.16

## AB-FUBINACA

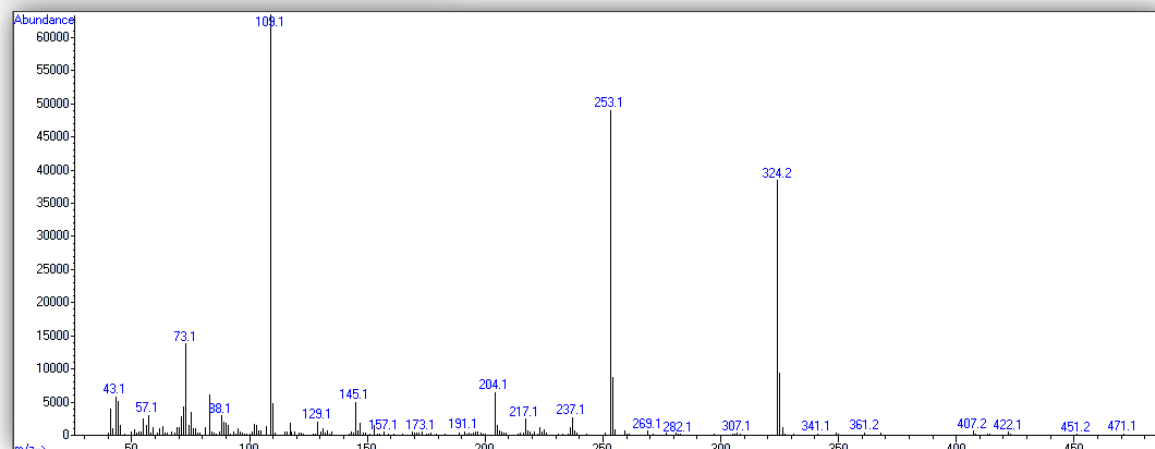




*...nel frattempo*



**AB-FUBINACA**



$\approx 2.5$  g



## CASO 6:

**Età:** 43 anni

**Genere:** Maschio

**Sintomi:** **Coma** per sospetta intossicazione da benzodizepine

**Dicharato:** Uso di sostanze sconosciute acquistate sul web

**Trattamento:** Flumazenil

Sangue ed urina sono stati mandate alla nostra Unità di Tossicologia Forense

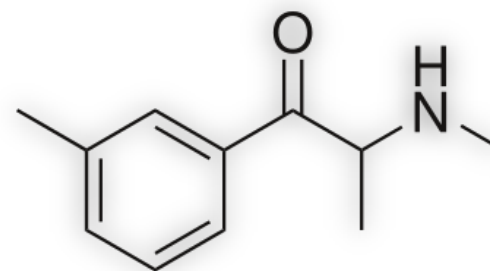
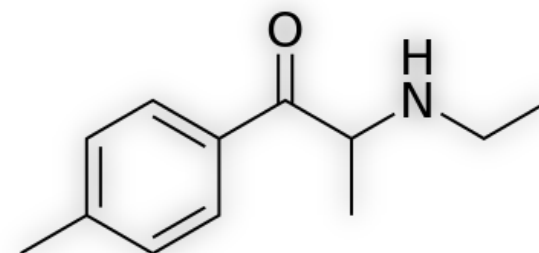


EMIT**POS** per ketamina e benzodiazepine

NEG per oppiacei, cannabinoidi, cocaina, metadone, barbiturici

LC-MS/MS analisi:

Composto	Sangue ng/mL	Urina ng/mL
3-MMC	667.5	4.9
4-MEC	3.9	0.2
Ketamina	0.01	0.3
Nor-ketamina	0.09	0.5

**3-MMC***(3-metilmetcatinone)***4-MEC***(4-metiletcatinone)*



## CASO 7:

**Età:** 32 anni

**Sesso:** Maschio

**Sintomi:** Collassato in un club, è stato portato in ospedale dove è avvenuto il decesso

Non ci sono altre informazioni

Campioni di sangue, urina, fegato, encefalo e bile sono stati mandati alla nostra Unità di Tossicologia Forense



**EMIT:**    **POS** per ketamina, MDMA and amfetamine  
NEG per oppiacei, benzodiazepine, cannabinoidi, cocaina,  
metadone, barbiturici

**LC-MS/MS:**

		<b>Ketamina</b>	<i>Nor-ketamina</i>	<b>MDMA</b>	<i>MDA<sup>a</sup></i>	<b>Metilone</b>
Fegato	ng/g	0.03	0.03	27,366	222	nd
Encefalo	ng/g	nd	nd	19,901	115	0.23
Sangue	ng/mL	0.03	0.03	18,523	133	0.42
Urina	ng/mL	0.01	0.01	32,940	218	0.59
Bile	ng/mL	0.01	0.01	7,383	75	nd

*<sup>a</sup> metabolita primario del MDMA*

**GC-MS analisi sui capelli:**

Hair	ng/mg	16.0	6.4	9.9	0.8	nd
------	-------	------	-----	-----	-----	----

*Cocaina ed il suo metabolita primario ( benzoilecgonina) sono stati trovati in tracce*



## CASO 8:

**Età:** 19 (A), 21 (B) anni  
**Sesso:** Maschi  
**Sintomi** (al ricovero) : Coma (Glasgow 3), acidosi respiratoria,  
anisocoria destra con pupille midriatiche e  
ipotermia

**Sintomi** (dopo circa 24 h): Delirio e agitazione

**Hanno dichiarato:** Elevata assunzione di alcol e ingestione di una  
pillola sconosciuta

**NEG** per le classiche sostanze d'abuso

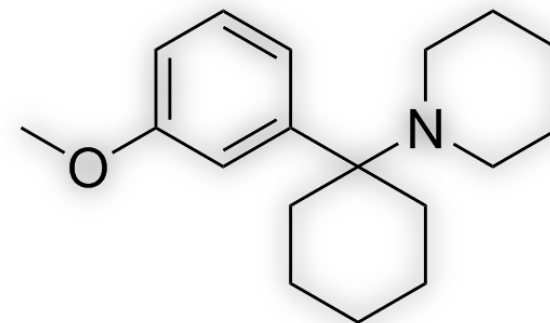
**ALCOLEMIA** 2.0 g/L for A  
1.7 g/L for B

Sangue ed urina sono stati mandate alla nostra Unità di Tossicologia Forense

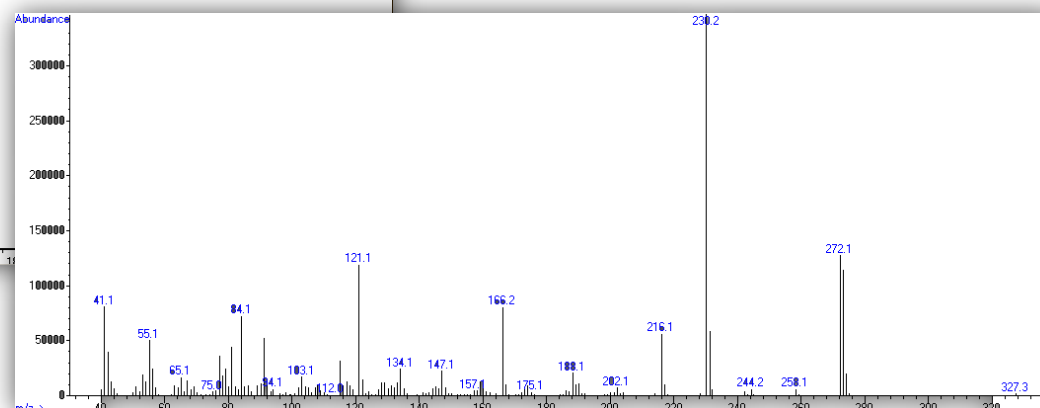
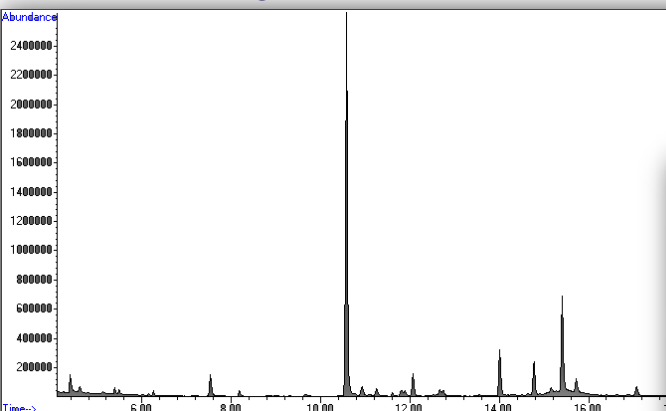


## LC-MS/MS:

Soggetto	Sangue ng/mL	Urina ng/mL
A	350.0	6109.2
B	180.1	3003.6



## Analisi generica in GC-MS :



**3-MeO-PCP**  
(3-Metossifenciclidina)

**La prima identificazione *in vivo* 3-MeO-PCP in Italia e una delle poche documentate nel mondo**

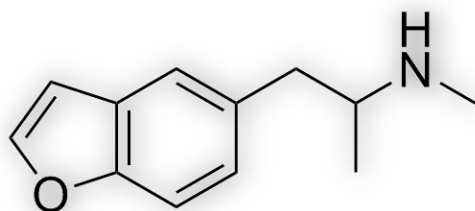
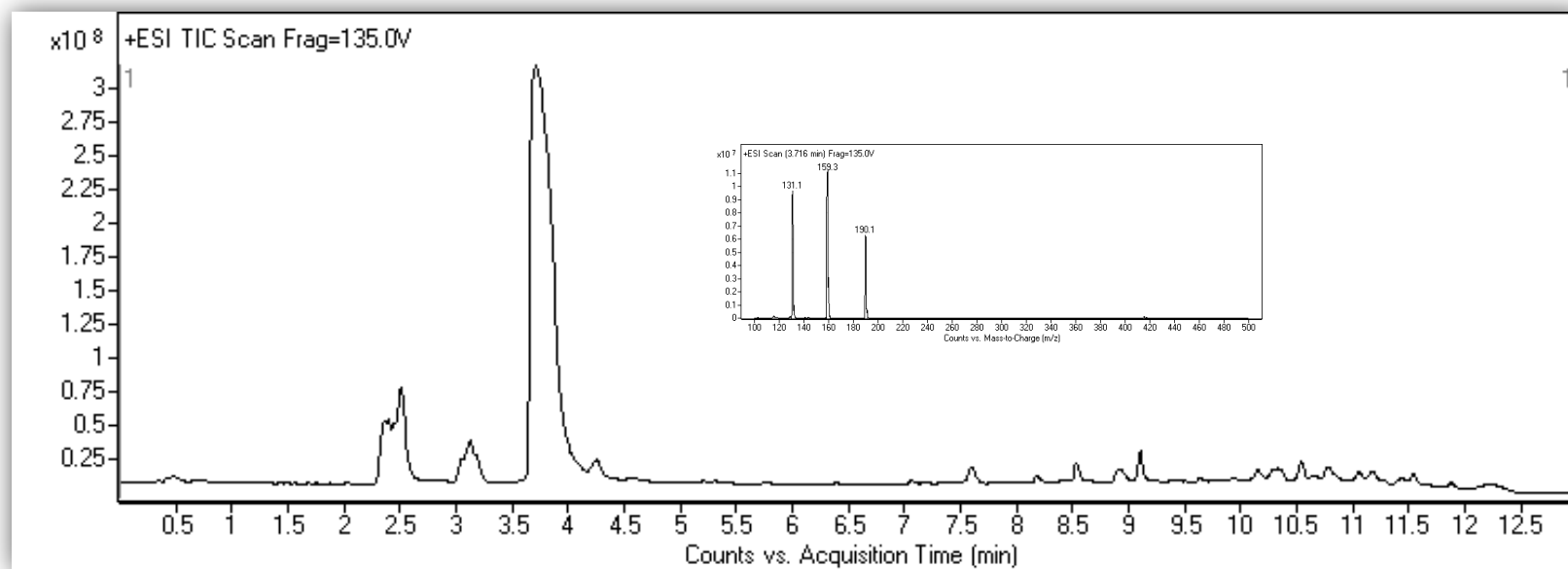


## *Qualche settimana fa...*

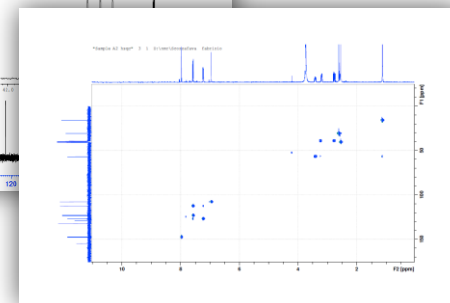
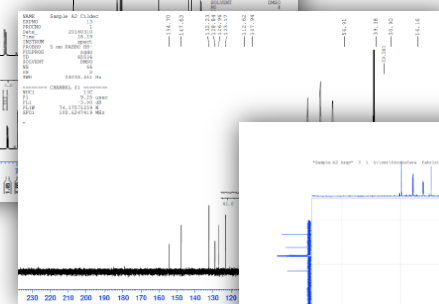
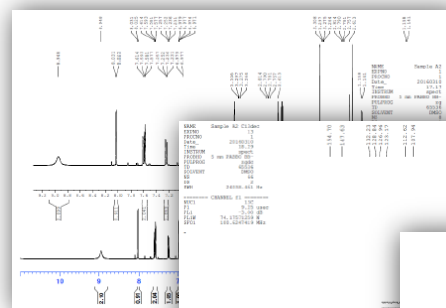
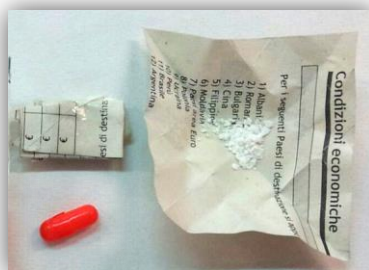
- 19 bustine di carta (polvere bianca)
- 3 capsule arancioni (polvere bianca)
- 1 capsula arancione (polvere giallognola)
- 1 capsula blu (polvere grigio/rossa)



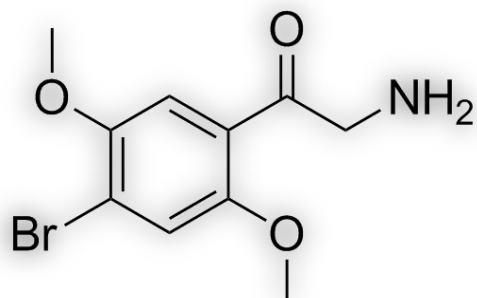
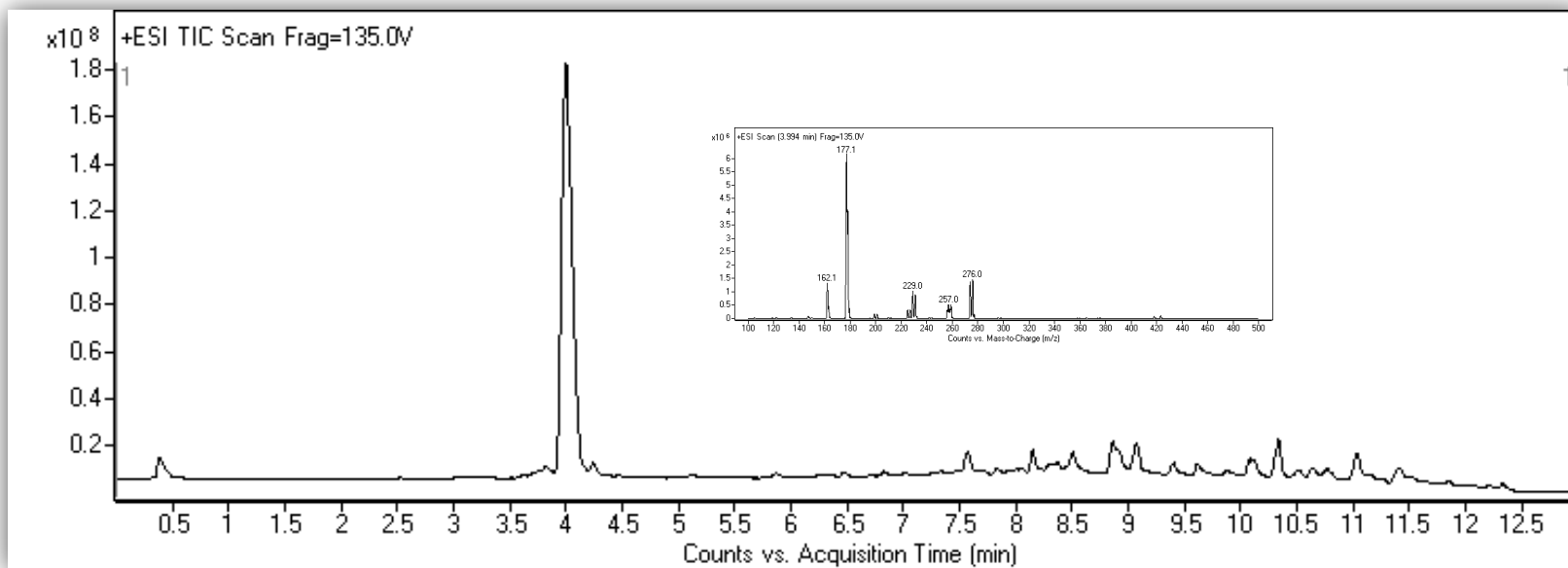




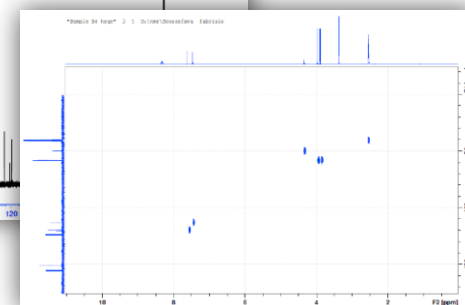
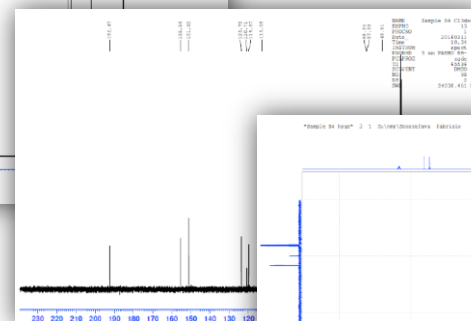
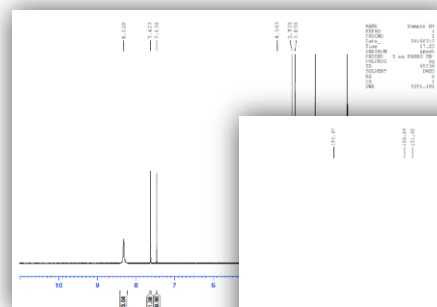
**5-MAPB**  
(fenetilamina)

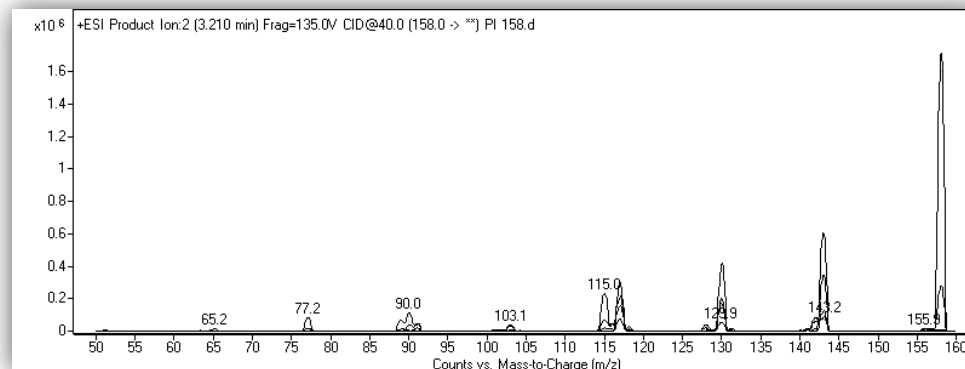
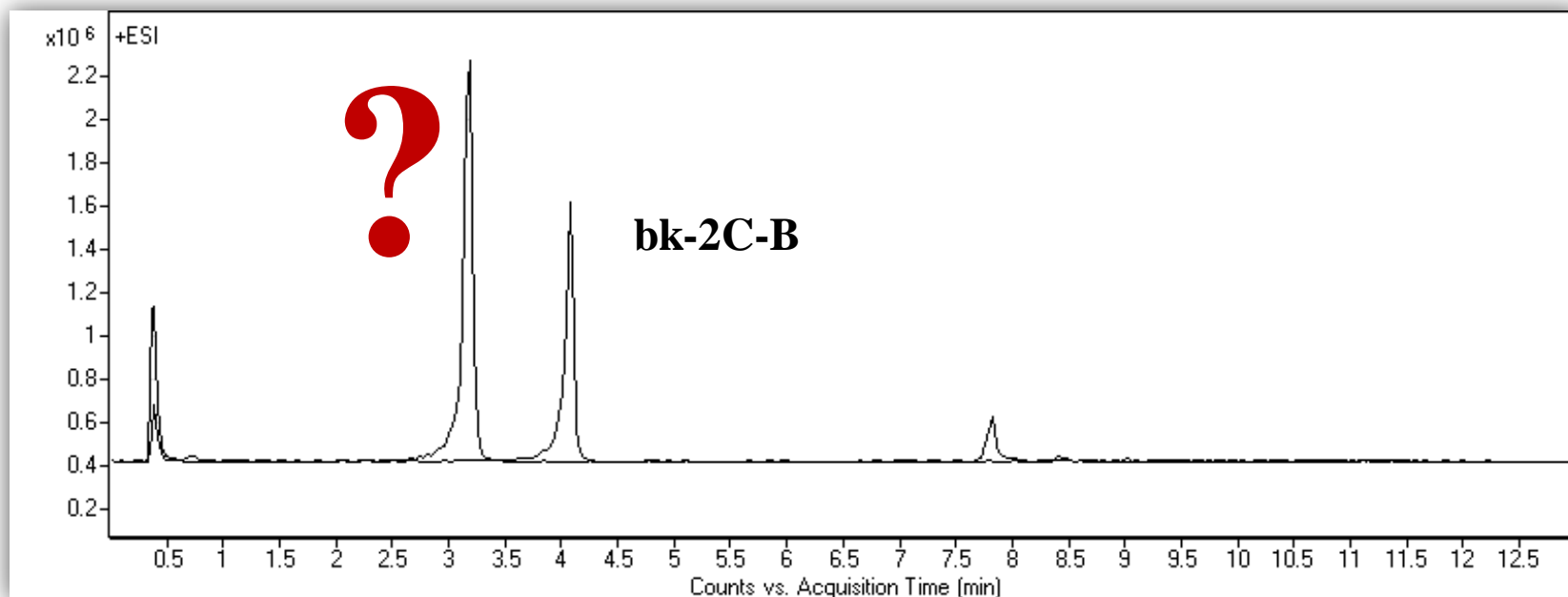






**βk-2C-B**  
(fenetilamina)





Studio in fase di approfondimento ( $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, HRMS) ...



- Prodotto secondario
- Intermedio di sintesi
- Nuova molecola

Studio in fase di approfondimento ( $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, HRMS) ...



## **-I Metodi analitici**

**-U.R.I.To.N** grazie al suo carattere multidisciplinare: Tossicologia Forense e Tossicologia Clinica, Neuroscienze, Farmacologia, Chimica e Medicina

- Progetti di ricerca come **I-SEE (Italy and South East Europe)**

rappresentano **STRUMENTI EFFICACI** per far fronte a questo problema