

UNIVERSITÀ
DI TORINO



Una strategia LC-MS/MS integrata per una rapida individuazione di NPS sospette in campioni reali di saliva

D. Serafini, M. Cirasola, I. Bracaglia, F. Bartolini, L. Chiodo, C. Montesano, M. Sergi, S. Marchetti,
V. Angeli, F. Pagano, F. Fanti, F. Eugelio



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA



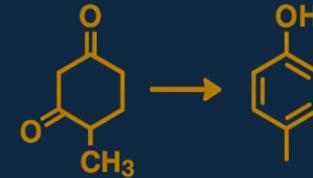


Possono derivare da modifiche a carico di altre droghe (classiche o NPS) o di prodotti farmaceutici, proponendosi come alternative legali alle sostanze psicoattive illecite “tradizionali”.

NPS



La loro diffusione nel mercato di NPS è recentemente aumentata a motivo di seria preoccupazione. Durante la crisi pandemica di COVID-19 l'accesso alle droghe tradizionali è modificato spostando il consumo le NPS.



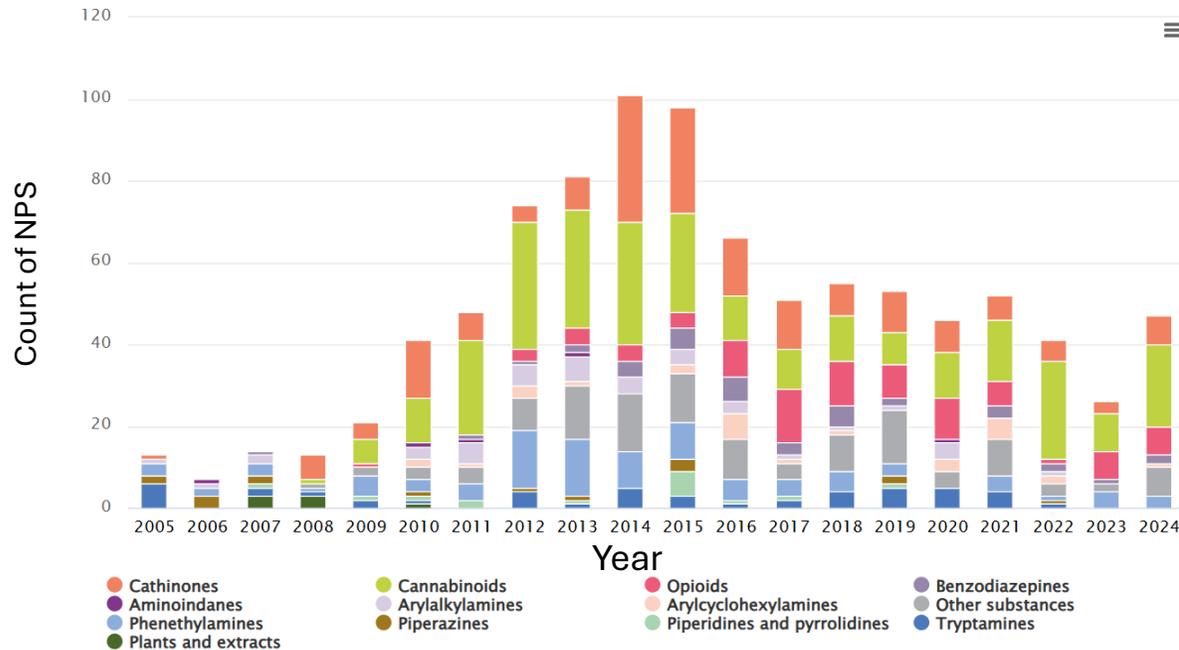
La diffusione incontrollata di NPS preoccupa a causa delle loro caratteristiche tossicologiche ancora poco conosciute e per le continue modifiche apportate alla loro struttura chimica al fine di evitare problemi normativi.



Monitoraggio delle NPS



Numero di nuove sostanze psicoattive segnalate per la prima volta al sistema di allarme rapido dell'UE, per categoria, 2005-2024



Nuove NPS ogni anno:

47 nuove NPS nel 2024

26 nuove NPS nel 2023

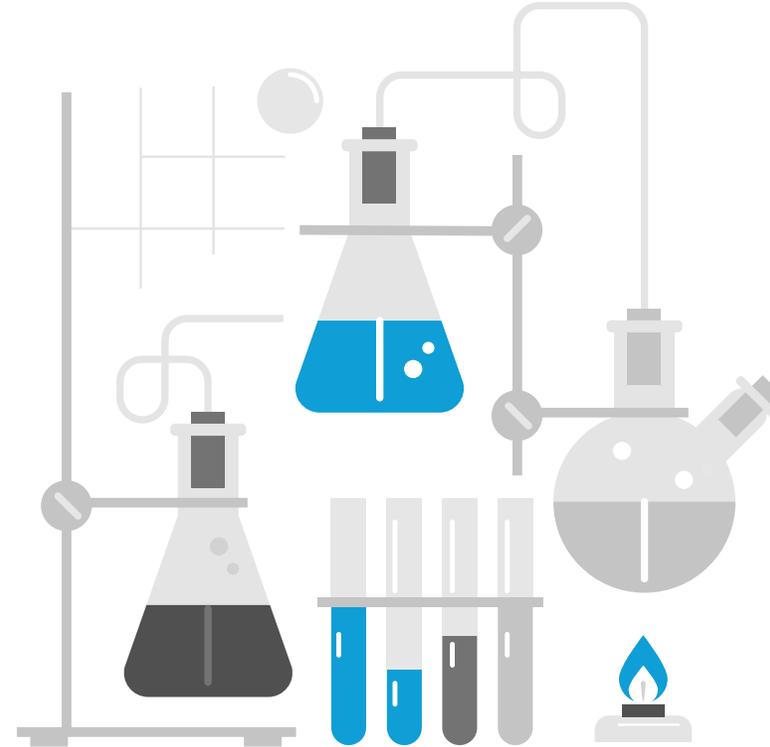
New psychoactive substances – the current situation in Europe (European Drug Report 2025) |

www.euda.europa.eu. (n.d.). https://www.euda.europa.eu/publications/european-drug-report/2025/new-psychoactive-substances_en



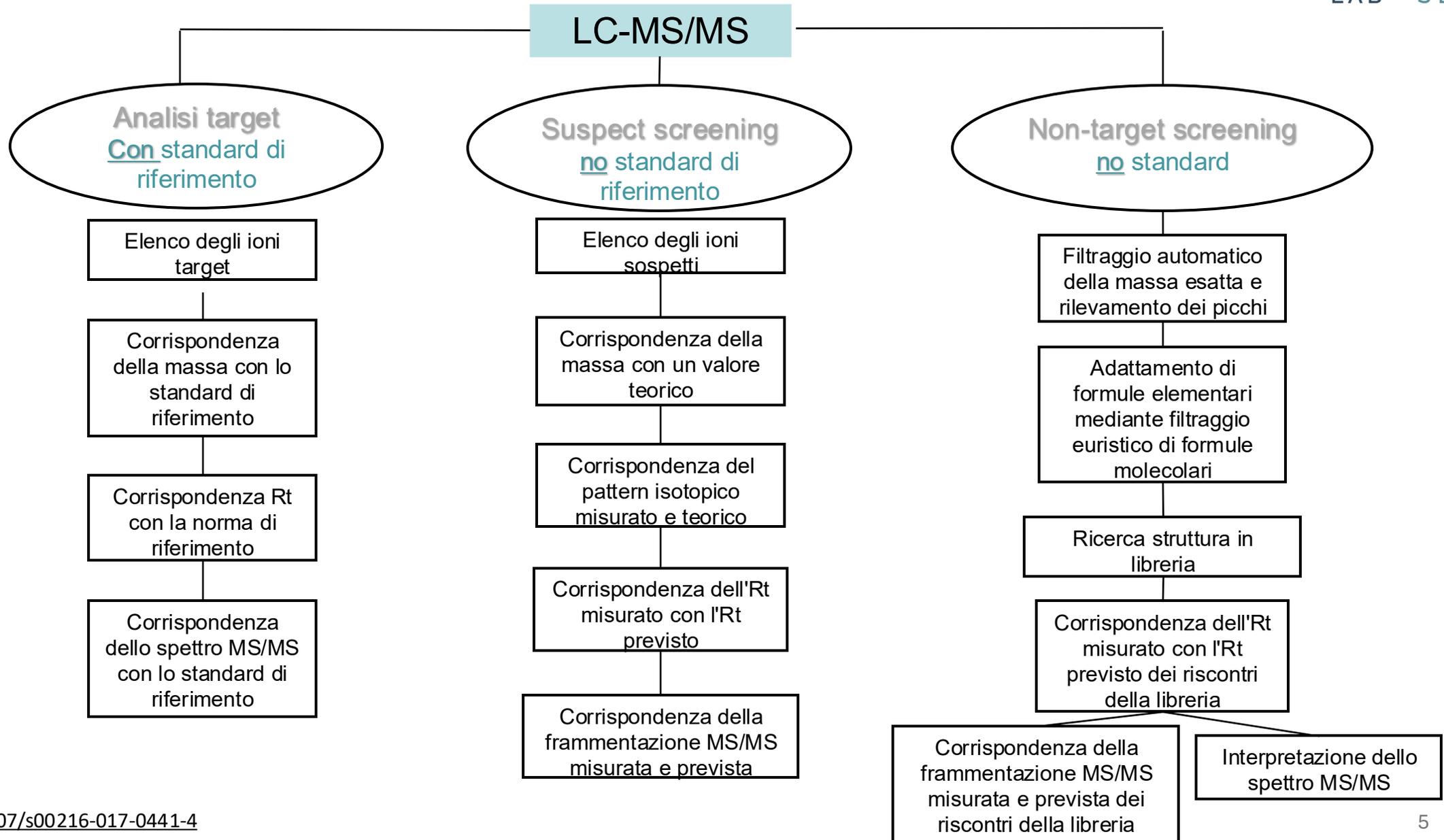
Analisi HPLC-MS(/MS)

- Golden standard per analisi di NPS
- Alta e bassa risoluzione
- Caratterizzazione delle NPS
- La modalità MRM → analisi quantitative in modalità target





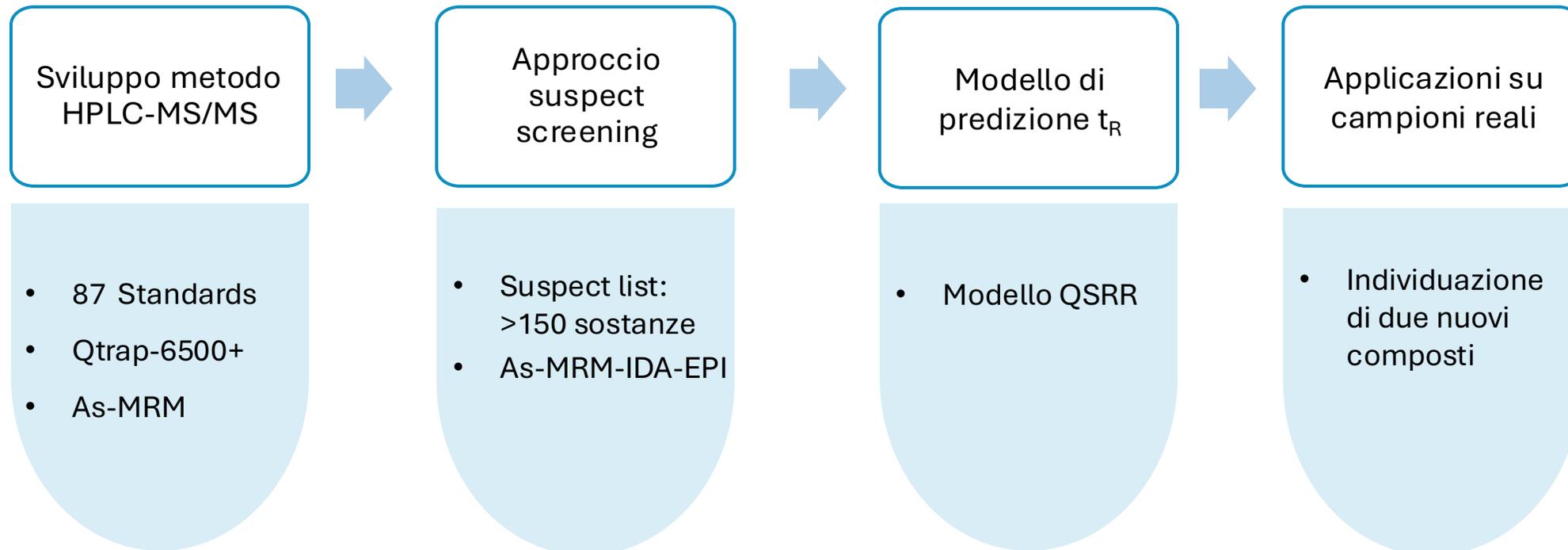
Tipologie di analisi





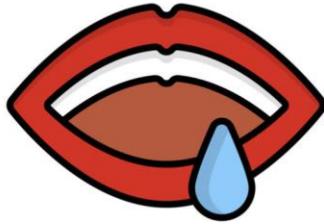
Scopo del lavoro

Sviluppo di un approccio analitico avanzato per il target e il suspect screening di sostanze d'abuso, comprese le NPS, in matrice salivare.





Matrici



Saliva

- 99% acqua
- 1% di sostanze organiche e inorganiche

Elementi non salivari

- Secrezioni, residui di cibo
- Cellule epiteliali desquamate
- Microrganismi
- Siero



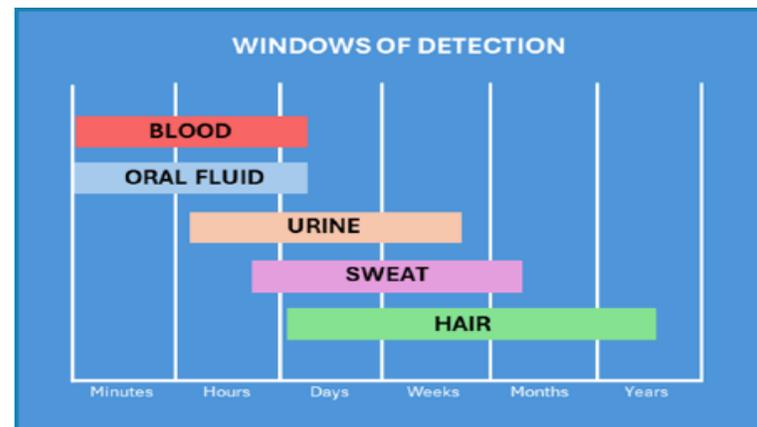
Vantaggi

- Raccolta facile
- Rischio minimo di adulterazione
- Rilevamento dell'uso recente
- Presenza di composto progenitore
- Rapporto noto tra liquidi orali e sangue



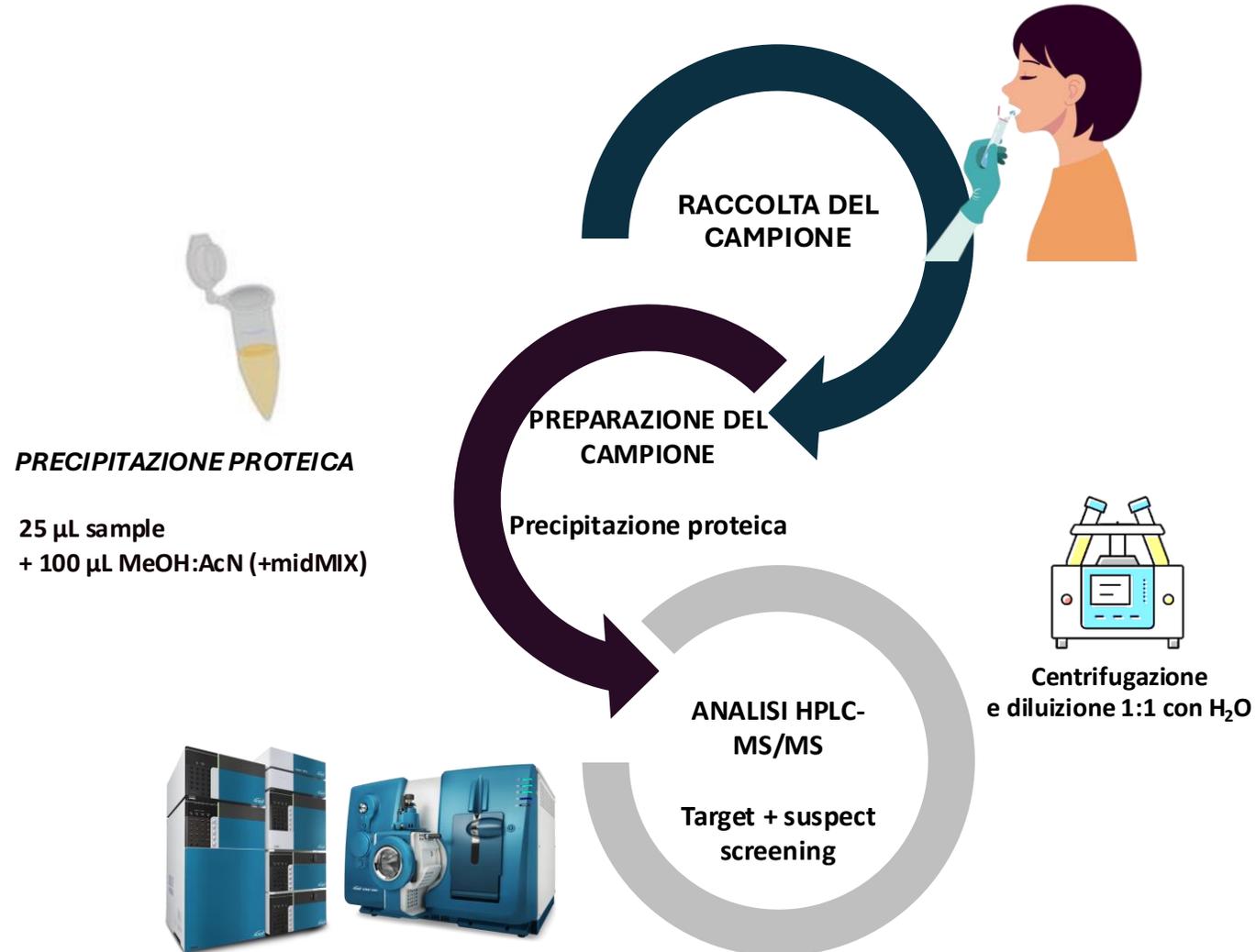
Applicazioni

- Monitoraggio terapeutico dei farmaci
- Indagini «guida sotto l'effetto di sostanze stupefacenti»
- Programmi di test antidroga sul posto di lavoro
- Antidoping





Procedura analitica

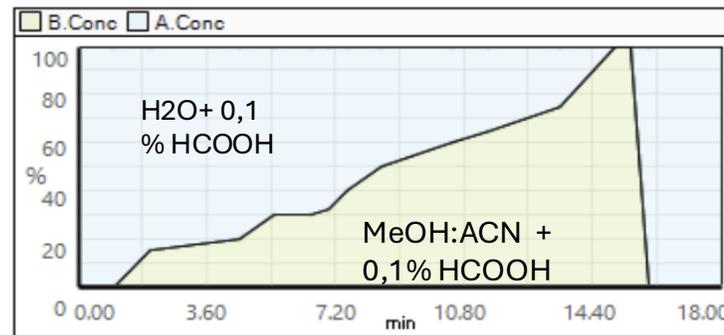
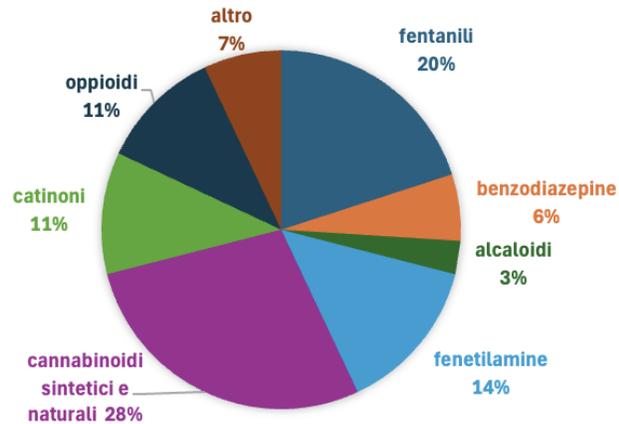




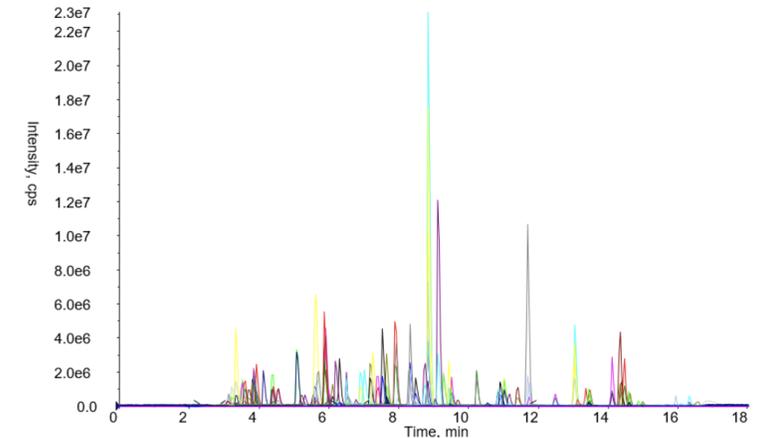
Metodo HPLC-MS/MS

Sistema LC Exion
Spettrometro di massa Sciex Qtrap 6500+

87 standard analitici + 11 IS-d



Colonna: Kinetex® Polar-C18, 100 Å, 100x2.1, 2.6 µm





Sviluppo e ottimizzazione del metodo target in MS/MS



MRM



- **Massa del precursore Q1 e del prodotto Q3**
- **DP, EP, CE, CXP**
- ✗ **N=174 → Dwell Time lungo**
(tempo necessario per l'acquisizione di una transizione)



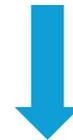
s-MRM



- **MRM Windows 60 s**
- **Dwell Time impostato dal software**



As-MRM



- **Dwell Weight**
(tempo assegnato a ciascuna transizione in base alla sua abbondanza)
- **Trigger Threshold**
(limite al di sopra del quale viene acquisita la seconda transizione MRM)
- **Dynamic Extended Window**



As-MRM

Maggior flessibilità

| ID | Drug Name | MRM window (sec) | Trigger Treashold | Extension Treshold | Dwell Weght | Q1 resolution | Q3 resolution |
|----|-------------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------|---------------|---------------|
| 35 | Norbuprenorfina | 30 | 455 | 1519 | 5 | High | High |
| 36 | Metadone | 30 | 126450 | 421500 | 1 | Unit | Unit |
| 47 | Metilone | 30 | 5439 | 18130 | 2 | High | High |
| 48 | Mefedrone | 30 | 4932 | 16440 | 2 | High | High |
| 49 | 2-MeoMet-Catinone | 30 | 25611 | 85370 | 2 | High | Unit |
| 50 | Bufedrone | 30 | 4590 | 15300 | 2 | High | High |
| 51 | Butilone | 30 | 3060 | 10200 | 3 | Unit | High |
| 52 | α -PVP | 30 | 4461 | 14870 | 2 | High | High |

MRM Detection Window

Trigger Threshold

Le transizioni MRM secondarie vengono attivate da quelle primarie quando il composto in eluizione supera una soglia preimpostata

Dynamic Extended Window

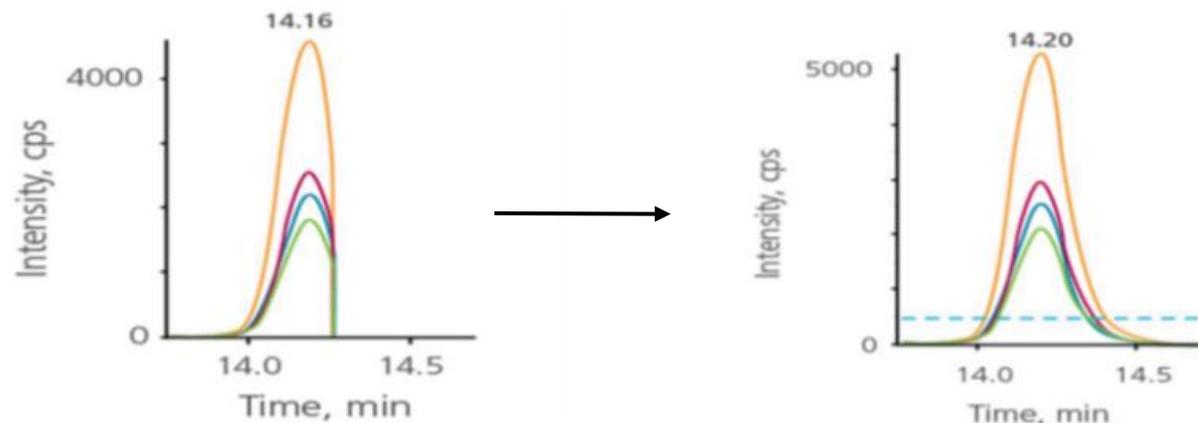
Aumento automatico della finestra di acquisizione per qualsiasi transizione MRM con intensità superiore a una soglia specificata

Dwell Weight

Il tempo di permanenza desiderato assegnato a ciascuna transizione MRM deve essere espresso come fattore relativo

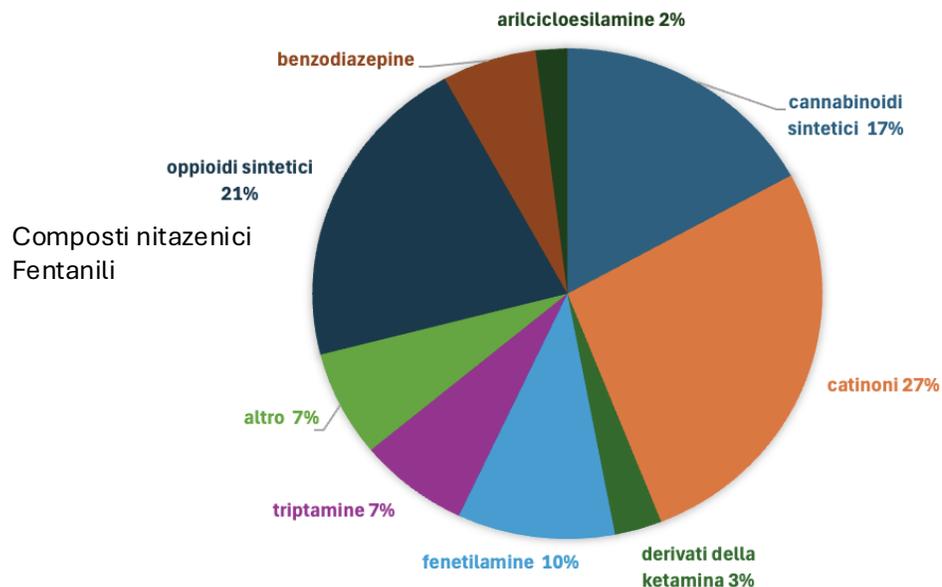
Q1/Q3 Resolution

Il rapporto sensibilità/specificità può essere personalizzato per ciascun analita, garantendo flessibilità del metodo



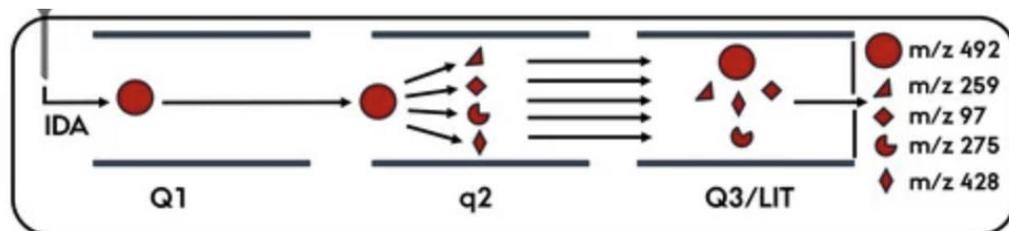


Approccio suspect screening



Composti nitazenici
Fentanili

70 NPS aggiunte al metodo suspect



Modalità di acquisizione:

As-MRM-Information Dependent Acquisition - Enhanced Product Ion

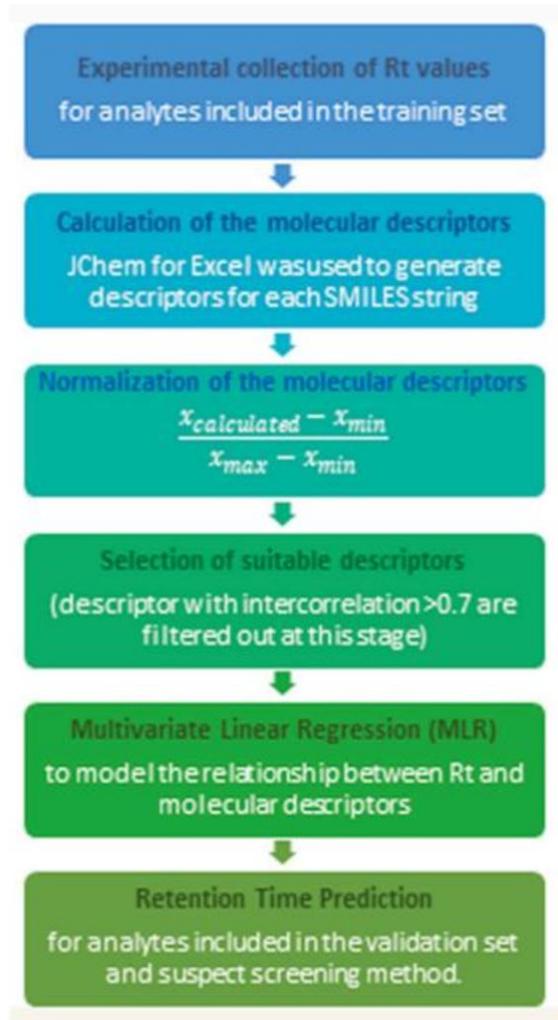
Work flow





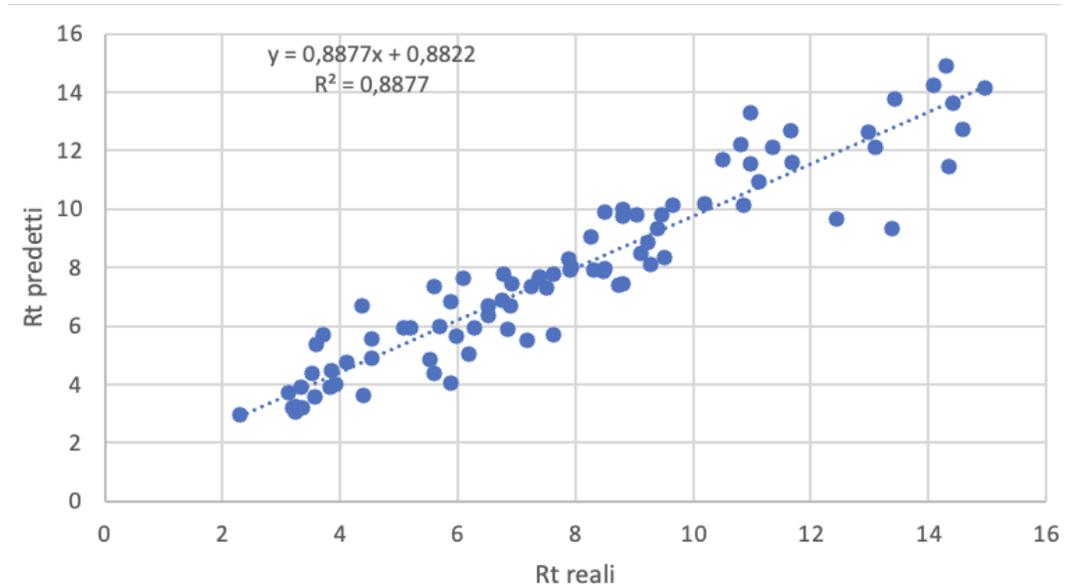
Quantitative Structure Retention Relationship (QSRR)

Rt previsto attraverso un modello QSRR



Training set: 87 analiti target

- *LogD (pH=5)*
- *Rifrattività*
- *Numero di anelli alifatici a 5 termini*
- *Numero di anelli alifatici a 6 termini*
- *Numero di siti accettori di legame H*
- *Numero di siti donatori di legame H*



$R^2 = 0,8877$

Errore assoluto medio = 0,81 min

Analisi di screening e conferma in loco



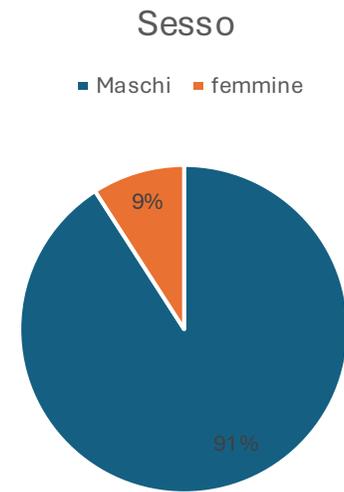
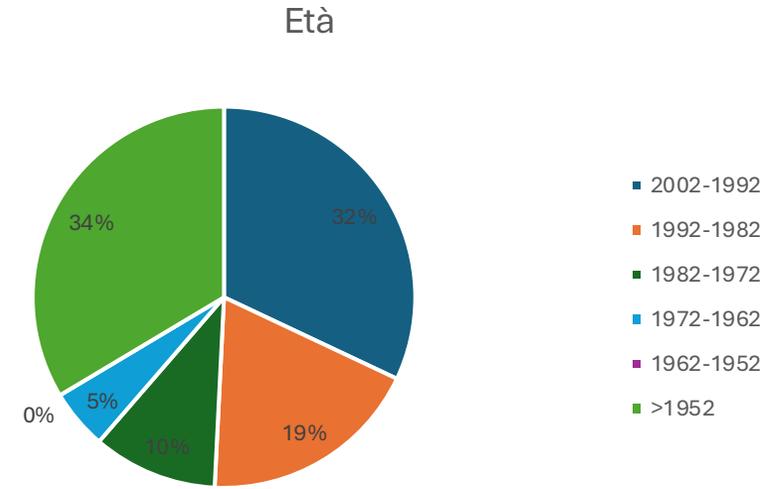
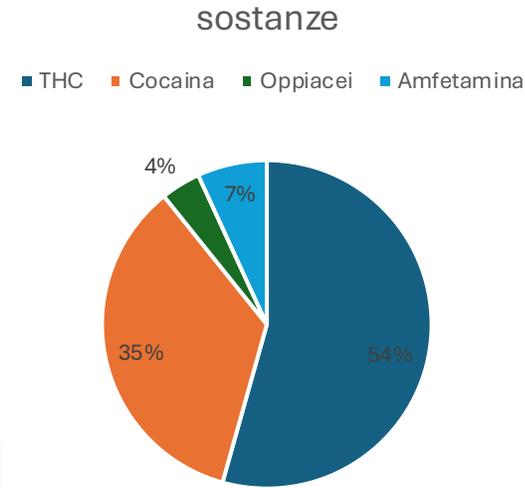
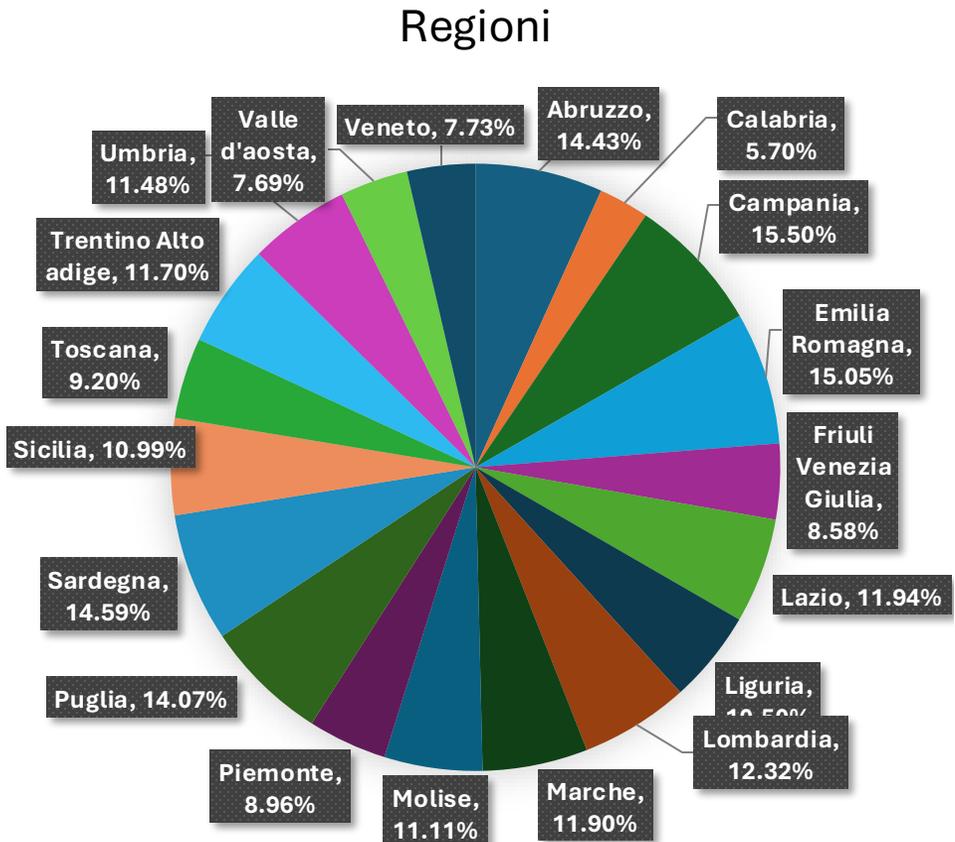
Analisi di screening



Analisi di conferma



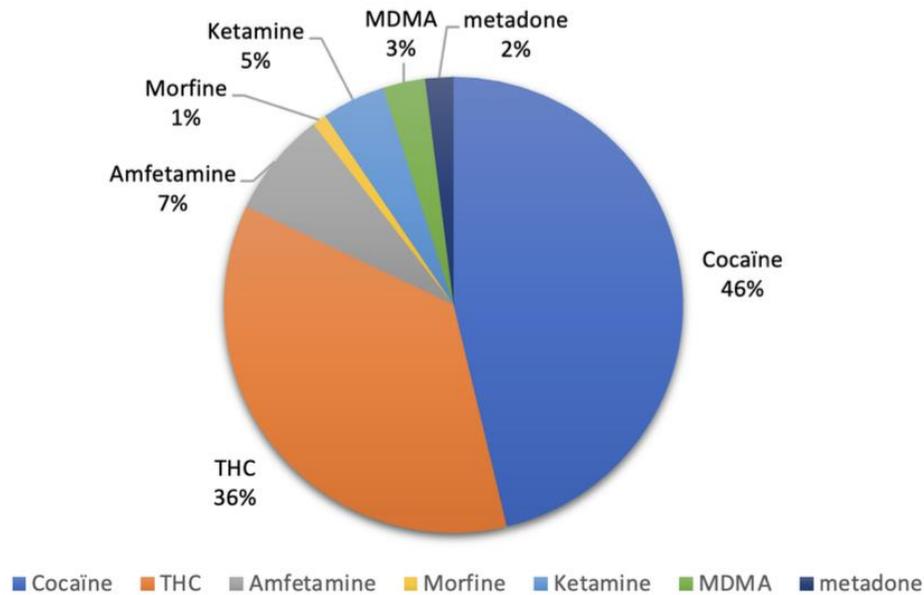
Statistiche 2022-2024



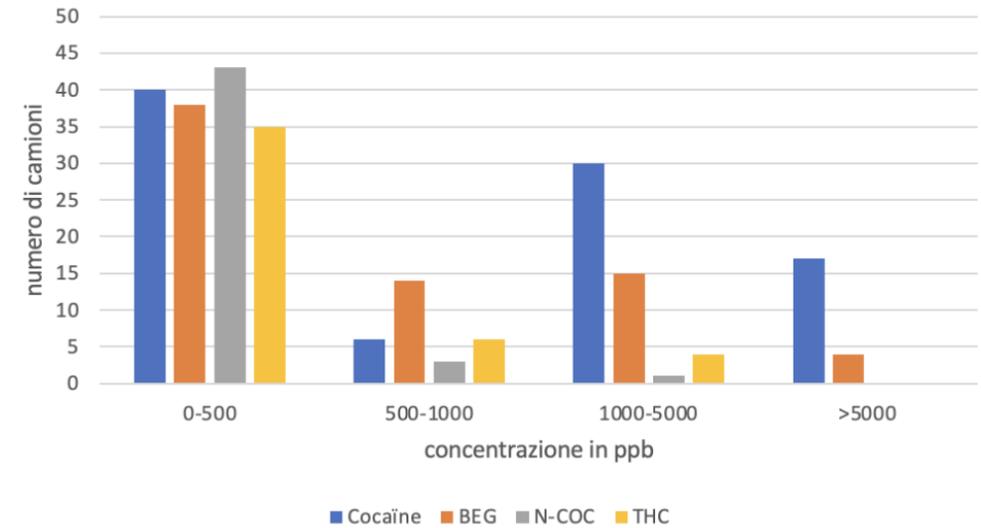


Risultati As-MRM

≈300 campioni



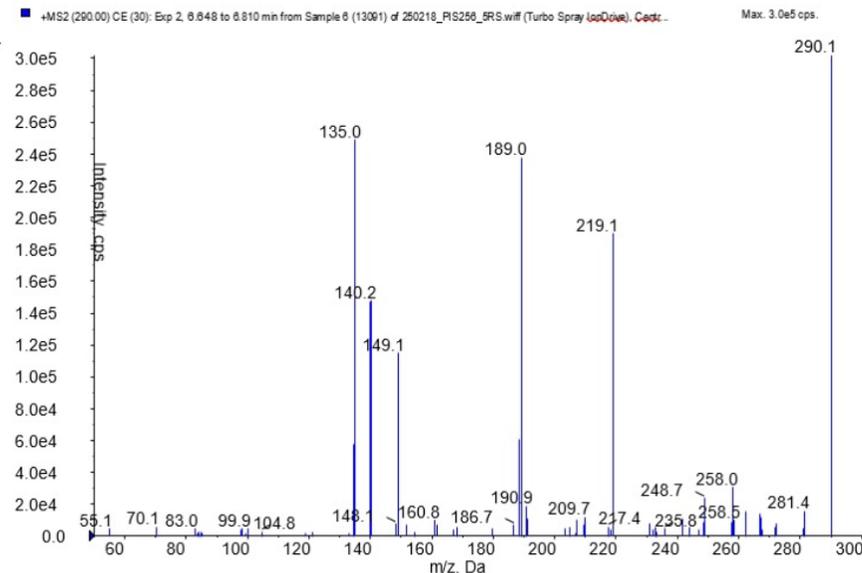
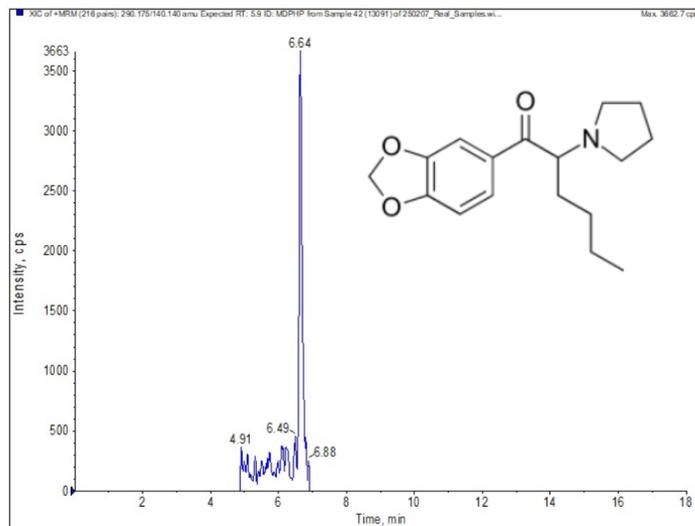
Analisi qualitativa



Analisi quantitativa



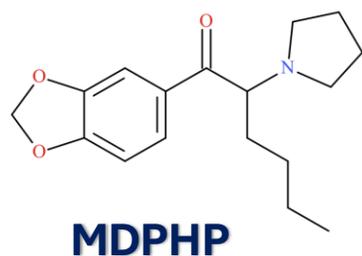
Analiti suspect individuati tramite IDA-EPI



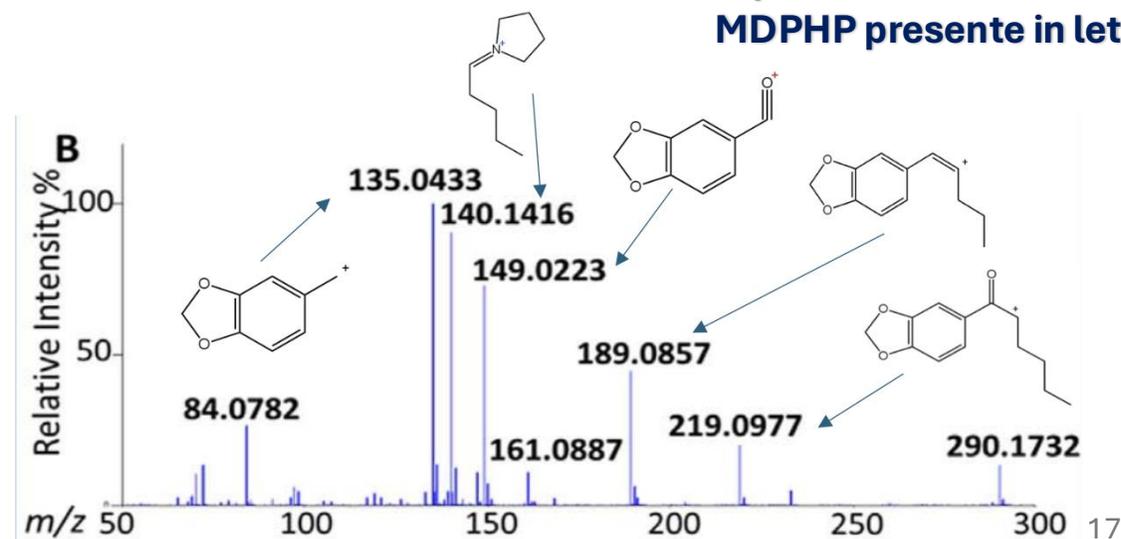
Tr predetto: 5,9 min
Tr sperimentale: 6,64 min

$\Delta Tr = 0,74$ min

Cromatogramma e spettro di frammentazione di MDPHP in un campione reale acquisito con modalità As-MRM-IDA-EPI

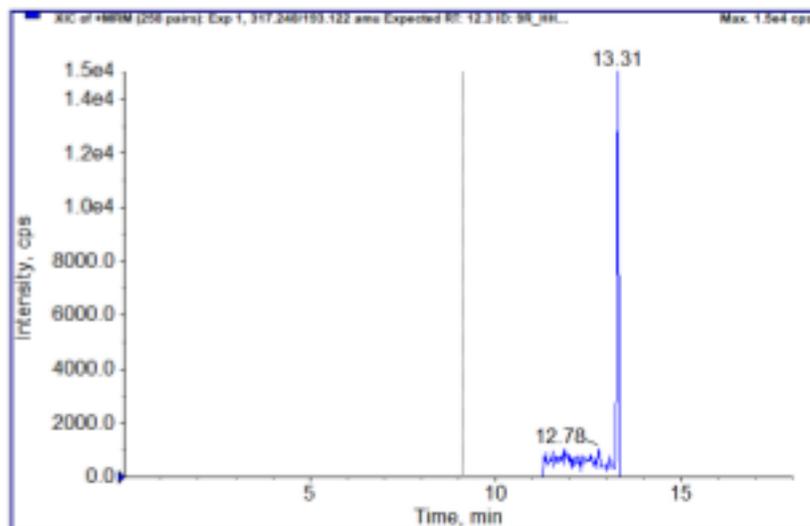


Spettro di frammentazione di MDPHP presente in letteratura

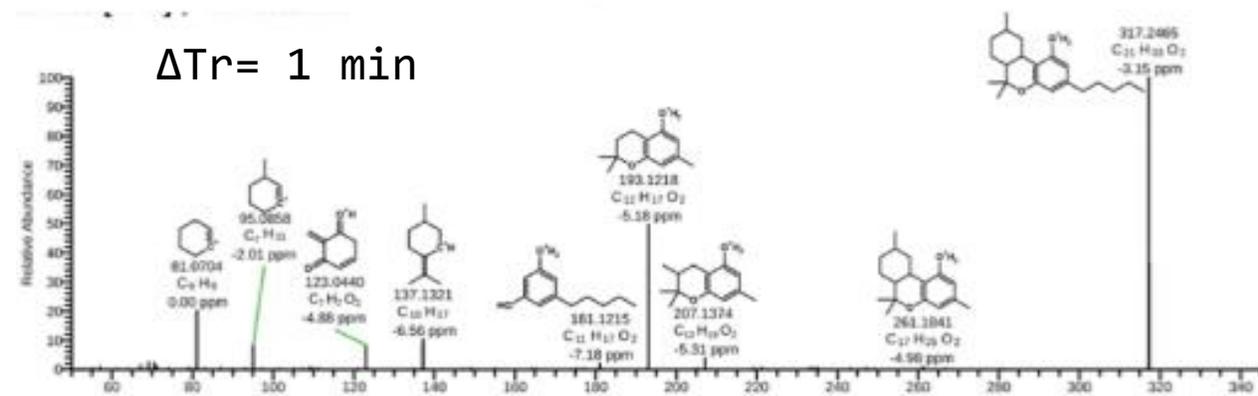




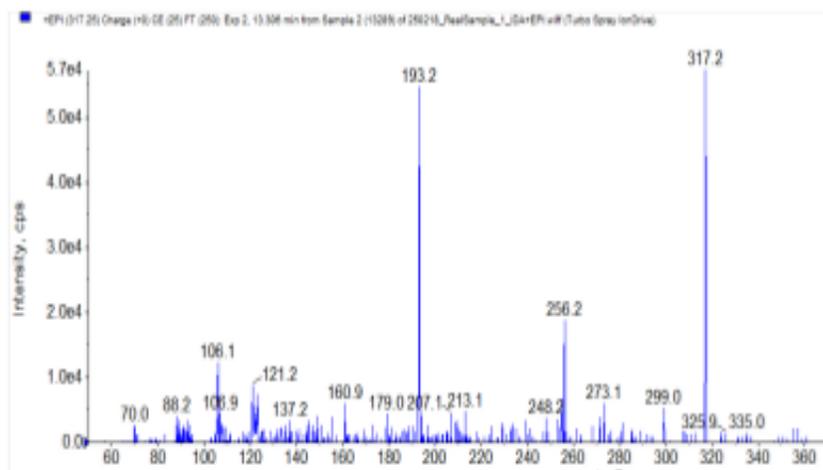
Analiti suspect individuati tramite IDA-EPI



Tr predetto: 12,31 min
Tr sperimentale: 13,31 min



Spettro di frammentazione di 9R-HHC presente nei database



Cromatogramma e spettro di frammentazione di 9R-HHC in un campione reale acquisito con modalità As-MRM-IDA-EPI





In conclusione

- La saliva si è rivelata una buona matrice per l'investigazione d'abuso di sostanze stupefacenti
- Metodo multi-target efficiente
- Modello QSRR affidabile
- Individuazione Rapida di nuove NPS immesse sul mercato



Vantaggi

- ✓ Individuazione facile e rapida di composti suspect in assenza di standard di riferimento
- ✓ Analisi con elevata sensibilità che consentono di ottenere spettri di frammentazione direttamente confrontabili con quelli presenti in letteratura

Prospettive future

Estensione del metodo per l'analisi di nuove sostanze emergenti

CONVEGNO DI CHIMICA ANALITICA FORENSE 2025

L'INNOVAZIONE SCIENTIFICA ALLA RICERCA DELLA PROVA



UNIVERSITÀ
DI TORINO



Grazie per la vostra attenzione

D. Serafini, M. Cirasola, I. Bracaglia, F. Bartolini, L. Chiodo, C. Montesano, M. Sergi, S. Marchetti,
V. Angeli, F. Pagano, F. Fanti, F. Eugelio



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

FORENSIC
LAB SERVICE