

Strategie analitiche per la ricerca di nuove sostanze psicoattive in campioni biologici

Alberto Salomone¹, Enrico Gerace¹, Denise Caneparo¹, Marco Vincenti^{1,2}

¹ Centro Regionale Antidoping "A. Bertinaria", Regione Gonzole 10, 10043 Orbassano, Torino, Italia

² Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Torino, via P. Giuria 7, 10125 Torino, Italia

Obiettivi: la difficoltà di riconoscimento analitico delle nuove sostanze psicoattive (NSP) nei campioni biologici limita la comprensione della reale diffusione di questi composti sul territorio. Nel nostro laboratorio ci siamo posti l'obiettivo di gestire le strategie di ricerca delle NSP soprattutto in ragione della tipologia di campioni disponibili e della finalità dell'accertamento.

Materiali e metodi: abbiamo valutato, su 45 campioni reali di urina, la reattività crociata verso i catinoni sintetici di due kit immunometrici per la ricerca di amfetamine e metamfetamine, per poi applicare un metodo di conferma in GC-MS per la determinazione di 18 catinoni sintetici, 2 catinoni naturali e 1 stimolante di recente introduzione. Per la determinazione dei cannabinoidi sintetici nella matrice cheratinica, abbiamo invece sviluppato e validato un metodo analitico basato sulla UHPLC-MS/MS per la ricerca di 23 composti, e lo abbiamo applicato su 344 campioni reali.

Risultati: su 45 campioni di urina, 19 sono risultati positivi a sostanze di struttura catinonica. Tra questi, 9 campioni erano positivi alla pseudoefedrina, 4 alla fenilpropanolamina, e 6 a molecole inserite nella lista delle sostanze illecite. Su 344 campioni di matrice cheratinica, 15 sono risultati positivi ad almeno un cannabinoide sintetico. I più frequenti sono stati il JWH-073 e il JWH-122.

Conclusioni: la molteplicità delle strutture chimiche delle NSP e dei loro metaboliti limita fortemente la possibilità di disporre di adeguate strategie di screening. Nel caso dei catinoni sintetici, è necessario che si applichino metodiche di conferma anche per questa tipologia di molecole, sui campioni che risultano positivi allo screening per amfetamine e metamfetamine. Nel caso dei cannabinoidi sintetici, l'analisi di sangue o capello permette una semplice ricerca delle droghe parenti, in modo da facilitare l'esecuzione di screening su ampie popolazioni di soggetti.

Parole chiave: catinoni sintetici, cannabinoidi sintetici, nuove sostanze psicoattive, screening, analisi del capello

Analytical strategies for the detection of new psychoactive substances in biological samples

Aim. Since most routine analyses do not include screening procedures for new psychoactive substances (NPS), the real understanding of their extent within the territory is limited. The aim of our laboratory was to set up an effective strategy for the detection of NPS, taking into consideration the available samples and the purpose of the investigation (e.g. driving relicensing or workplace drug testing). Materials and methods. Immunometric screening test of 45 urine samples were performed and subjected to confirmation for both amphetamines and synthetic cathinones detection. Such test was performed using a new specific GC-MS method developed for the detection of 18 synthetic cathinones, 2 natural cathinones and 1 recently trafficked amphetamine. An UHPLC-MS/MS method for the detection of 23 synthetic cannabinoids in keratin matrix was also developed and applied to 344 real hair samples.

Results. 19 urine samples out of 45 turned out positive to at least one targeted substance: 9 to pseudoephedrine, 4 to phenylpropanolamine and 6 to illicit cathinones. Out of 344 samples (keratin matrix), 15 samples turned out positive to at least one synthetic cannabinoid. Several cases of poly-abuse were observed. JWH-073 and JWH-122 were the most frequently detected drugs.

Conclusions. Due to the wide range of NPS chemical structures and metabolites, the possibility to develop and implement effective screening strategies become extremely challenging. Positive outcomes from amphetamines/metamphetamines immunochemical screening tests require further validations as well as natural and synthetic cathinones. On the other hand, blood and hair analysis can be used to effectively determine the diffusion of synthetic cannabinoids among the population by detecting the parent drugs, instead of their largely unknown metabolites.

Keywords: synthetic cathinones, synthetic cannabinoids, new psychoactive substances, screening, hair analysis

Contatti: Dott. Alberto Salomone

Centro Regionale Antidoping "A. Bertinaria"

Regione Gonzole 10/1 - 10043 Orbassano, Torino, Italy

tel.: +39 011 90224232 fax: +39 011 90224242 cell.: +39 3489330145

email: alberto.salomone@antidoping.piemonte.it

Introduzione

È ormai noto come negli ultimi anni si stia assistendo all'introduzione sempre più massiccia sul mercato di una nuova gamma di prodotti che mimano gli effetti delle droghe d'abuso tradizionali. La grandissima maggioranza di queste nuove sostanze psicoattive (NSP) sono riconducibili a due classi principali: i cannabinoidi sintetici e i catinoni sintetici. Entrambe annoverano svariati composti che, attraverso piccole modifiche della struttura chimica e della procedura di sintesi, rendono complessi i controlli di laboratorio e ritardano la loro stessa inclusione fra le sostanze di consumo illecito. I cannabinoidi sintetici, talvolta venduti su internet o negli smart shops come incensi o profumatori ambientali, rappresentano le NSP più diffuse a livello mondiale^{1,2}, al punto che sono stati già riportati numerosi casi di intossicazione, anche sul territorio italiano³. Analogamente, i catinoni sintetici vengono distribuiti sul mercato on-line e spesso camuffati come sali da bagno o fertilizzanti⁴, ma sono in realtà assunti dall'utilizzatore, per lo più per via nasale, in virtù dell'elevata azione stimolante. Anche per i catinoni sintetici gli effetti collaterali a livello neurologico e cardiovascolare possono essere estremamente critici⁵.

La difficoltà di riconoscimento analitico delle NSP nei campioni biologici limita drammaticamente la possibilità di comprendere la reale diffusione di questi composti sul territorio, così come la relazione tra utilizzo di NSP e incidenti stradali o sul lavoro^{6,7}. Tale difficoltà è dovuta (i) alla molteplicità delle loro strutture chimiche, (ii) alla scarsa disponibilità degli standard puri di riferimento, in particolare dei metaboliti; (iii) alla scarsa disponibilità e rapida obsolescenza di kit immunochimici con cui eseguire screening ad ampio spettro⁸, (iv) alla rapida biotrasformazione di gran parte delle NSP, per cui spesso i loro metaboliti da ricercare nelle urine non sono noti. Di conseguenza, almeno per i cannabinoidi sintetici, la possibilità di effettuare analisi di screening appare limitata, sia mediante tecniche immunochimiche sia mediante LC-MS/MS. Diversamente, la ricerca delle NSP in altre matrici biologiche, quali sangue o capello, appare meno problematica, in quanto vi si possono ricercare le sostanze assunte anziché i loro metaboliti. In questi casi, la strategia analitica è altresì facilitata dalla più ampia disponibilità di standard analitici, nonché dalla possibilità di aggiornare i metodi analitici inserendo le nuove sostanze progressivamente introdotte sul mercato^{9,10}.

Gli ambiti di intervento nei quali appare più urgente che i laboratori di tossicologia forense applichino un'adeguata strategia analitica per la determinazione delle NSP, sono essenzialmente tre. Nei controlli svolti nel contesto dell'incidentalità stradale, l'assenza di dispositivi di screening "on-site" rende impraticabile la possibilità di accertamento da parte delle Forze dell'Ordine; è pertanto necessario che i campioni biologici vengano inviati ai laboratori di analisi tossicologica che sono attrezzati a ricercare anche le NSP (quantomeno quelle già segnalate e più diffuse sul territorio nazionale), e che non si limitano alla ricerca delle sole sostanze stupefacenti tradizionali e dell'etanolemia.

Il secondo ambito di interesse è quello lavorativo, dove il D.L. 81 del 9/4/2008 ha reso obbligatori i controlli periodici mirati al riconoscimento dell'uso di sostanze stupefacenti sui lavoratori che eseguano mansioni che comportano rischi nei

confronti di soggetti terzi. Benché le sostanze da ricercare sulla matrice urinaria, secondo specificazione di legge, siano quelle tradizionali, emerge progressivamente il riconoscimento della possibilità che i soggetti assuntori dismettano l'uso delle sostanze notoriamente ricercate, per passare al consumo delle NSP, al fine di non risultare positivi ai controlli.

Il terzo campo in cui i laboratori di tossicologia forense sono chiamati a cimentarsi è quello degli esami eseguiti su soggetti che vogliono ottenere il rinnovo o il reintegro della patente di guida, di competenza specifica delle Commissioni Mediche Locali. In questi casi, anche se spesso gli esami su urina sono ancora parte del protocollo accertativo, l'attenzione è focalizzata sulla matrice cheratinica.

A seconda del contesto di applicazione, è evidente che le strategie di analisi che comprendano le NSP vadano gestite in maniera differente, anche in ragione della diversa tipologia di campione disponibile. Nel caso dei campioni urinari, tipici del "workplace testing", nel nostro laboratorio ci siamo inizialmente posti il problema della determinazione dei catinoni sintetici, di struttura simile alle amfetamine e di limitata biotrasformazione. Dal momento che i campioni urinari vengono tipicamente sottoposti a screening immunometrico, abbiamo studiato la reattività crociata di due kit immunochimici per la ricerca di amfetamine e metamfetamine per verificare se eventuali positività, anche basse, ad uno dei due sistemi, fossero invece imputabili alla presenza di molecole catinoniche. Su 45 campioni reali risultati positivi negli screening di amfetamine e metamfetamine, oltre alla consueta metodica di conferma per le amfetamine, sono stati applicati altri due metodi: il primo, è stato appositamente sviluppato e validato per la determinazione di 18 catinoni sintetici, 2 catinoni naturali e 1 stimolante di recente introduzione, mentre il secondo è stato predisposto per la differenziazione della catina (sostanza catinonica di origine naturale) dal suo diastereoisomero fenilpropanolamina.

L'analisi della matrice cheratinica consente invece la determinazione dei cannabinoidi sintetici, non biotrasformati, conseguente ad un consumo reiterato nel tempo. Abbiamo quindi sviluppato e validato un metodo analitico basato sulla UHPLC-MS/MS per la ricerca di 23 cannabinoidi sintetici, e lo abbiamo applicato su 344 campioni reali.

Materiali e Metodi

Tutti gli standard analitici di riferimento sono stati acquistati da Cayman Chemical (Michigan, USA), da LGC Standards (Milano, Italia), Sigma-Aldrich (Milano, Italia), Bertin Pharma (Montigny-le-Bretonneux, Francia), o gentilmente forniti dal Sistema Nazionale di Allerta Precoce del Dipartimento Politiche Antidroga, attraverso l'Istituto Superiore di Sanità (Roma, Italia). Tutti i reagenti chimici, i solventi e i derivatizzanti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Le soluzioni degli standard sono state conservate a -20°C fino al momento dell'uso. Le soluzioni di lavoro sono state preparate in metanolo alla concentrazione finale di 100 ng/mL.

Preparazione del campione urinario per la ricerca di catinoni

Due mL di urina sono stati addizionati con una miscela di standard interni (amfetamina-d6 e difenilamina), in modo da ottenere una concentrazione finale di 250 ng/mL. Il pH è stato portato a $10 \div 12$ tramite l'aggiunta di NaOH 1N e la soluzione è stata estratta con 10 mL di terz-butimetil etero (TBME). La fase organica surnatante è stata trasferita ed evaporata sotto flusso di azoto, utilizzando un Techne Sample Concentrator (Barloworld Scientific, Stone, UK). Sul residuo, è stata eseguita una derivatizzazione mediante aggiunta di 50 μ L di anidride trifluoroacetica, scaldando a 65°C per 30 min. Dopo ulteriore evaporazione, il residuo finale è stato ridisciolti in 50 μ L di TBME, e 1 μ L è stato iniettato nel GC. Nel secondo metodo analitico, atto a differenziare la catina dalla fenilpropanolamina (diastereoisomeri), il metiltestosterone è stato utilizzato come standard interno e la N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamide come agente derivatizzante; i restanti procedimenti sono analoghi a quelli descritti per la prima metodica.

Analisi GC/MS per la ricerca di catinoni

Le analisi sono state eseguite utilizzando un gas-cromatografo 6890N, accoppiato con uno spettrometro di massa 5975 inert Mass Selective Detector (Agilent Technologies, Milano, Italia). La separazione cromatografica è stata ottenuta con una colonna capillare HP-5 (17m \times 200 μ m \times 0,33 μ m), fornita da J&W Scientific (Agilent, Santa Clara -USA).

Preparazione del campione cheratinico per la ricerca di cannabinoidi

Un'aliquota di circa 10 mg di matrice cheratinica (capelli o peli) è stata sottoposta a due lavaggi con diclorometano, asciugata sotto flusso di azoto e tagliata in frammenti di circa 1-2 mm. Dopo l'aggiunta di 5 μ L di una miscela di standard interni (JWH-018-d₉, JWH-250-d₅, JWH-081-d₉ e JWH-200-d₅) in modo da ottenere una concentrazione finale di 50 pg/mg (150 pg/mg per THC-d₃), il campione è stato addizionato di 1 mL di NaOH 1N e scaldato a 95 °C per 10 min. Successivamente, il campione è stato estratto con 5 mL di n-esano/etilacetato 90:10 (v/v). La fase organica è stata quindi evaporata sotto flusso di azoto a 70°C e il residuo secco è stato ripreso con 200 μ L di metanolo. Infine, 1 μ L della soluzione è stato iniettato nel sistema UHPLC-MS/MS.

Analisi UHPLC-MS/MS per la ricerca di cannabinoidi

Le analisi sono state eseguite utilizzando un cromatografo liquido Shimadzu LC-30A (Shimadzu, Duisburg, Germania) interfacciato con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 5500 (ABSciex, Darmstadt, Germania) fornito di una sorgente electrospray Turbo Ion operante in ionizzazione positiva. La separazione cromatografica degli analiti è stata ottenuta con una colonna Acquity UPLC BEH C18 100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m (Waters Corporation, Italia), protetta da una pre-colonna C18 VanGuard. La temperatura della colon-

na è stata mantenuta a 50°C e le fasi mobili utilizzate erano, rispettivamente, acqua/acido formico 20 mM con ammonio formiato 2 mM (solvente A) e acetonitrile/acido formico 20 mM (solvente B). Dopo un'iniziale eluizione isocratica al 75% di A per 0.5 min, la composizione delle fasi mobili è stata modificata secondo un gradiente lineare (A:B; v/v) da 75:25 a 0:100 in 5.5 min; infine, è stata eseguita per 1.0 min. un'eluizione isocratica al 100% di B. Il flusso era di 0.5 mL/min per una durata totale della corsa cromatografica di 9.0 min, inclusa la riequilibrio della colonna tra due successive iniezioni.

Validazione dei metodi

Entrambi i metodi sono stati validati in accordo con le raccomandazioni e i criteri della norma UNI EN ISO 17025 e con le più importanti linee guida nazionali ed internazionali del settore^{11,12}. Sono stati valutati i seguenti parametri: selettività, specificità, range di linearità, limiti di rilevazione e quantificazione (LOD e LOQ), precisione inter-day e intra-day, accuratezza, carry-over, recupero ed effetto matrice. I risultati della validazione metodologica sono riportati in altra sede^{7,13}.

Applicazione su campioni reali

Ricerca di catinoni

Sono stati selezionati 45 campioni di urina umana (39 maschi e 6 femmine; età media di 27 anni, intervallo: 15-47 anni), precedentemente analizzati nel nostro laboratorio negli ambiti dei controlli sul rispetto del Codice della Strada e delle commissioni mediche locali, delle analisi inerenti le mansioni lavorative a rischio per soggetti terzi, degli accertamenti per motivi clinici o commissionati dai Servizi per le Dipendenze (Ser.D.).

Ricerca di cannabinoidi

Sono stati selezionati 344 campioni di matrice cheratinica, precedentemente analizzati nel nostro laboratorio nell'ambito dei controlli per le commissioni mediche locali (rinnovo patente di guida) o inviati dai Ser.D.. Di questi, 264 erano risultati positivi, al di sopra dei valori di cut-off¹⁴, per almeno una sostanza tra THC, amfetamine, cocaina, oppiacei e metadone. I rimanenti 80 erano stati analizzati per la determinazione dell'etilglucuronato (EtG). I campioni sono stati divisi in 3 gruppi. Il Gruppo A consisteva di 129 campioni (100 capelli, 26 peli pubici, 2 peli ascellari, 1 peli toracici), prelevati a soggetti positivi al THC, dei quali 107 erano positivi solamente al THC e 22 presentavano policonsumo.

Il Gruppo B includeva 135 campioni (124 capelli, 6 peli pubici, 4 peli ascellari, 1 peli toracici) provenienti da consumatori cronici di almeno una sostanza tra amfetamine, cocaina, oppiacei e metadone; tra questi, 116 campioni erano risultati consumatori di una sola sostanza, e 19 di almeno due sostanze.

Il Gruppo C consisteva di 80 campioni (76 di capelli e 4 di peli toracici) precedentemente analizzati per la determinazione dell'EtG; tra questi, 59 campioni presentavano un valore di EtG inferiore a 30 pg/mg, mentre per gli altri 21 il risultato era superiore al cut-off^{15,16}.

| Cam- pione | Valore di screening per amfetamine | Risultato conferma | Concetrazone (µg/mL) | Altre positività | Farmaci assunti conte- nenti Pseudoefedrina |
|---------------|---------------------------------------|---|----------------------|-----------------------------------|--|
| 1 | 695 | Catina | 2,37 | Pseudoefedrina | Actigrip |
| 2 | >2000 | Fenilpropanolamina | 0,08 | Amfetamina e THC | Dato non disponibile |
| 3 | 727 | Catina | 3,43 | Pseudoefedrina | Reactine |
| 4 | 615 | Catina | 1,60 | Pseudoefedrina | Reactine |
| 5 | 1248 | Catina | 5,21 | Pseudoefedrina | Reactine |
| 6 | 828† | Butilone | 1,78 | MDMA e THC | Dato non disponibile |
| 7 | >2000 | Butilone | 0,76 | MDMA | Dato non disponibile |
| 8 | Non disponibile | Butilone | 8,39 | MDA e MDMA | Dato non disponibile |
| 9 | Non disponibile | Butilone | 5,51 | MDA e MDMA | Dato non disponibile |
| 10 | >2000 | Fenilpropanolamina | 0,20 | MDA, MDMA, Oppiacei e Cocaina | Dato non disponibile |
| 11 | >2000 | Fenilpropanolamina; 4-Fluoroamfetamina | 0,41 0,85 | Amfetamina e THC | Dato non disponibile |
| 12 | >2000 | Fenilpropanolamina | 0,11 | Amfetamina, Ketamina e Cocaina | Dato non disponibile |
| 13 | 681 | Catina | 1,12 | Pseudoefedrina | Dato non disponibile |
| 14 | 747 | Mefedrone | 80,5 | / | Dato non disponibile |
| 15 | Non disponibile | Catina | 4,96 | Pseudoefedrina | Dato non disponibile |
| 16 | 507 | Catina | 0,81 | Pseudoefedrina | Antistaminico (non precisato) |
| 17 | 1561 | Catina | 3,68 | Pseudoefedrina | Antistaminico (non precisato) |
| 18 | 634 | Catina | 3,68 | Pseudoefedrina | Reactine |
| 19 | 981 | 3-Metilmetcatinone | 42,7 | THC | Dato non disponibile |

†: creatinuria: 11 mg/dL

Tab. 1 - Riepilogo dei campioni reali positivi a molecole di tipo catinonico

Risultati

Ricerca di Catinoni

Su 45 campioni analizzati, tutti risultati positivi allo screening per le amfetamine, 19 hanno dato evidenza della presenza di sostanze di natura catinonica (pari al 42% dei casi), secondo il metodo GC-MS messo a punto nel presente studio. In Tab. 1 vengono riportati i risultati ottenuti dall'analisi in GC/MS, unitamente alle altre positività riscontrate sul campione mediante ulteriori metodi di conferma precedentemente sviluppati. Tra i campioni riportati in Tab. 1, 9 sono risultati positivi alla catina, 4 alla fenilpropanolamina, 4 al butilone, 1 al mefedrone e 1 al 3-metilmetcatinone. Non esistendo, ad oggi, un cut-off specifico di riferimento per la classe dei catinoni, tutti i campioni dovrebbero essere considerati positivi, indipendentemente dai valori di concentrazione rilevati. Per differenziare la catina dal suo diastereoisomero fenilpropanolamina (Tab. 1), entrambi generati dalla biotrasformazione del catinone, e tra la catina e il suo possibile precursore pseudoefedrina, principio attivo comune a molti farmaci, sono stati condotti ulteriori approfondimenti, fra cui la messa a punto dello specifico metodo descritto più sopra. Va inoltre ricordato che anche la molecola di amfetamina viene parzialmente metabolizzata a fenilpropanolamina. Lo schema riassuntivo delle diverse vie di biosintesi della catina è mostrato in Fig. 1, per maggior chiarezza.

Nei 4 campioni positivi alla fenilpropanolamina (n. 2, 10, 11 e 12), tale molecola è quindi verosimilmente presente in quanto metabolita di molecole amfetaminiche, peraltro positivamente riscontrate. Si noti anche, nel caso 11, l'assunzione della 4-fluoroamfetamina, di recente introduzione benché non appartenente alla classe dei catinonici, unitamente ad amfetamina e THC. Nei 9 campioni positivi alla catina (n. 1, 3, 4, 5, 13, 15, 16, 17 e 18), è stata sempre rilevata la presenza di pseudoefedrina, probabilmente in seguito all'assunzione di farmaci, quali ad esempio antistaminici e decongestionanti (vedi Tab. 1), come poi verificato in sede anamnestica in 7 casi. Si noti invece che in nessun campione è stata osservata la contemporanea presenza di fenilpropanolamina e catina, come ci si sarebbe aspettati nel caso di assunzione di catinone. In sintesi, tutte le positività che abbiamo riscontrato per catina e fenilpropanolamina sono da attribuirsi all'assunzione di altre sostanze, di natura lecita o illecita, ma non ai catinonici di recente introduzione.

Nei restanti 6 casi, vale la conclusione opposta, dove le positività riscontrate sono assai verosimilmente da attribuirsi all'assunzione di catinonici (butilone, mefedrone, 3-metilmetcatinone), talora in combinazione con sostanze illecite più tradizionali.

Per 10 degli 11 campioni che in sede di conferma hanno fornito risposta di positività per le molecole catinoniche ma non a quelle amfetaminiche (n. 1, 3, 4, 5, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19), è interessante notare la reattività crociata con i kit immunometrici

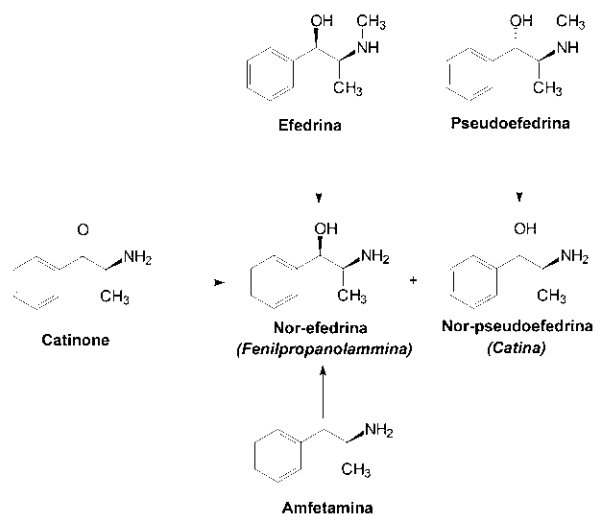


Fig. 1 - Diverse vie di biosintesi della catina

specifici per la classe delle amfetamine. Per tutti questi campioni si è ottenuto un valore semiquantitativo superiore o prossimo al valore di soglia comunemente impiegato. Ad esempio, il campione 19, nel quale è stata successivamente riscontrata la presenza di 3-metilmecatino, era risultato precedentemente positivo allo screening per le classi delle amfetamine e dei cannabinoidi, ma l'analisi di conferma aveva escluso la presenza di sostanze stupefacenti di tipo amfetaminico. Pertanto, secondo le procedure tradizionali di screening e conferma, tale campione sarebbe stato classificato come un "falso positivo" dell'analisi di screening per le amfetamine. L'analisi per la ricerca delle sostanze catinoniche di cui al presente studio ha invece rivelato la positività per il 3-metilmecatino, sostanza illecita, confermando sia la positività riscontrata allo screening, sia l'esistenza di una reattività crociata con i kit immunoenzimatici impiegati.

Tuttavia, tale reattività crociata è assai differenziata per i diversi kit immunometrici disponibili in commercio e per le diverse sostanze di struttura catinonica. Il presente studio è stato svolto su campioni già risultati positivi ad almeno uno screening immunometrico; tuttavia, è facile ipotizzare che altri campioni, che risultino negativi agli screening per le amfetamine, possano invece contenere sostanze stupefacenti di struttura catinonica e risultino quindi "falsi negativi" qualora queste ultime sostanze non vengano specificamente ricercate.

Ricerca di Cannabinoidi

Dei 344 campioni di matrice cheratinica analizzati, 15 sono risultati positivi ad almeno un cannabinoide sintetico; di questi, 12 appartenevano a soggetti di sesso maschile. Analizzando la provenienza dei campioni positivi, 12 campioni (9.3% del totale) appartenevano a soggetti già utilizzatori di prodotti derivati dalla Cannabis (gruppo A), mentre i restanti 3 (2.2% del totale) provenivano da soggetti poliassuntori. Non sono invece state rilevate positività ai cannabinoidi sintetici in nessuno dei soggetti con precedente storia di abuso alcolico (gruppo C). L'età media dei soggetti positivi a cannabinoidi sintetici

è risultata pari a 24 anni circa e circoscritta in un intervallo compreso tra i 18 e i 32 anni, evidenziando così la giovane età degli assuntori di queste sostanze.

La sostanza maggiormente riscontrata nei campioni positivi è stata il JWH-073, rilevato in 11 campioni a concentrazioni comprese tra 1.6 e 50.5 pg/mg (media 7.69 pg/mg), mentre 8 campioni sono risultati positivi al JWH-122. In questo caso, le concentrazioni di JWH-122 sono risultate sensibilmente superiori e oscillavano tra i 7.4 e i 2800 pg/mg (media 544 pg/mg). Altre positività sono emerse per il JWH-250 (6 campioni), JWH-081 (5 campioni), JWH-018 (3 campioni), JWH-210 e JWH-019 (2 campioni) e per l'AM-1220 (1 campione). Tutti i risultati ottenuti sono riassunti in Tab. 2. Complessivamente, dei 23 cannabinoidi sintetici che il metodo analitico consentiva di ricercare nei campioni, si sono riscontrate positività per 8 sostanze. Un'analisi attenta dei risultati evidenzia che in 9 dei 15 casi di positività a cannabinoidi sintetici è stata riscontrata la presenza di un'altra sola sostanza (THC in 8 casi, cocaina in 1 caso), mentre i restanti 6 casi sono riconducibili a soggetti poliassuntori ove 2 o più sostanze sono state rilevate (THC e amfetamine in 4 casi, cocaina e oppiacei in 1 caso e cocaina e amfetamine in 1 caso).

È opportuno sottolineare che la contemporanea positività ad altra sostanza non deve stupire in quanto essa ha costituito, nel presente studio, il criterio per selezionare i campioni da sottoporre all'analisi dei cannabinoidi sintetici. Si può invece ipotizzare che i soggetti controllati periodicamente per ragioni lavorative o per il rinnovo della patente di guida possano essere indotti a sostituire completamente il consumo dei prodotti della Cannabis con i cannabinoidi sintetici, al fine di sfuggire ai comuni test analitici.

Nello studio presentato, su un totale di 15 campioni positivi a cannabinoidi sintetici, in 5 casi le concentrazioni di almeno una sostanza superavano il valore di 50 pg/mg. Sebbene la concentrazione di 50 pg/mg di THC nel capello rappresenti il valore di cut-off internazionalmente riconosciuto per provare il consumo ripetuto di prodotti derivati dalla Cannabis, escludendo la contaminazione esterna, nessuna indicazione viene offerta dall'attuale ricerca scientifica per quanto riguarda il consumo di cannabinoidi sintetici. Pertanto, per una corretta interpretazione delle positività ai cannabinoidi sintetici rilevate nei campioni di capello analizzati, andrebbero eseguiti ulteriori studi, ad esempio miranti all'individuazione, sempre nella matrice cheratinica, dei principali metaboliti dei cannabinoidi sintetici, come già avviene per il THC.

Conclusioni

Le difficoltà nello sviluppare adeguati protocolli di screening per le nuove sostanze psicoattive (NSP) limitano l'efficacia di molti dei controlli che ricoprono un ruolo fondamentale nell'attività di tutela della sicurezza pubblica, primi fra tutti quelli svolti nel contrasto dell'incidentalità stradale e sui lavoratori che svolgono mansioni a rischio per i soggetti terzi. Ne deriva una scarsa comprensione della reale diffusione delle NSP sul territorio, ma anche una carente identificazione di soggetti che dismettano l'uso delle sostanze stupefacenti notoriamente ricercate, per passare al consumo di questi nuovi prodotti illeciti. Il riconoscimento analitico delle NSP

| Caso | Gruppo | Età | Sesso | Matrice | JWH-018 (pg/mg) | JWH-073 (pg/mg) | JWH-250 (pg/mg) | JWH-081 (pg/mg) | JWH-122 (pg/mg) | JWH-210 (pg/mg) | JWH-019 (pg/mg) | AM-1220 | Altri risultati ^a |
|------|--------|-----|-------|---------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------|--|
| 1 | A | 24 | M | capello | - | 1.6 | - | - | - | - | - | - | THC: 0.05 ng/mg; MDMA: 0.56 ng/mg |
| 2 | A | 27 | F | capello | 17.3 | 7.6 | 83.4 | 12.3 | - | - | - | - | THC: 0.07 ng/mg |
| 3 | A | 22 | M | capello | - | 1.9 | 26.9 | - | - | - | - | - | THC: 0.05 ng/mg; MDMA: 0.57 ng/mg |
| 4 | A | 32 | F | capello | - | 1.8 | - | - | - | - | - | - | THC: 0.28 ng/mg |
| 5 | A | 23 | M | capello | - | 5.2 | 5.8 | - | 11.7 | - | - | - | THC: 0.09 ng/mg |
| 6 | A | 20 | M | capello | 10.4 | 2.0 | 6.0 | - | 2800 | 2.3 | - | 1.3 | THC: 0.14 ng/mg |
| 7 | A | 25 | M | capello | - | 1.8 | - | - | - | - | - | - | THC: 0.27 ng/mg; AMP: 3.05 ng/mg; MDMA: 0.56 ng/mg |
| 8 | A | 26 | M | capello | - | - | - | 8.0 | - | - | - | - | THC: 4.57 ng/mg; MDMA: 0.17 ng/mg |
| 9 | A | 18 | M | capello | - | 50.5 | 6.4 | 194 | 710 | - | - | - | THC: 0.09 ng/mg |
| 10 | A | 23 | M | capello | - | 1.6 | - | - | 760 | - | - | - | THC: 0.11 ng/mg |
| 11 | A | 21 | M | capello | 3.1 | 1.6 | - | 81.4 | - | 5.1 | - | - | THC: 0.24 ng/mg |
| 12 | A | 23 | M | capello | - | 9.0 | 4.8 | - | 40.9 | - | - | - | THC: 0.15 ng/mg |
| 13 | B | 21 | M | capello | - | - | - | - | 7.4 | - | - | - | COC: 1.76 ng/mg; BZE: 0.22 ng/mg |
| 14 | B | 32 | F | capello | - | - | - | - | 11.2 | - | 3.8 | - | COC: 0.60 ng/mg; BZE: 0.09 ng/mg; MOR: 0.08 ng/mg; 6-MAM: 0.25 ng/mg |
| 15 | B | 22 | M | capello | - | - | - | 47.8 | 15.8 | - | 4.1 | - | COC: 0.61 ng/mg; AMP: 0.53 ng/mg; MDMA: 0.89 ng/mg |

Tab. 2 - Riepilogo dei campioni reali positivi a cannabinoidi sintetici

^aTHC: Δ^9 -tetraidrocannabinolo; MDMA: 3,4-metilendiossietamfetamina; AMP: Amfetamina; COC: Cocaina; MOR: Morfina; 6-MAM: 6-monoacetilmorfina.

nei campioni biologici rappresenta quindi, per i laboratori di tossicologia forense, una problematica di difficile soluzione ma anche una necessità urgente. A seconda del contesto di applicazione, è evidente che le strategie di analisi che comprendano le NSP vadano gestite in maniera differente, anche in ragione della tipologia di campione disponibile.

Nel caso dei catinoni sintetici, abbiamo sperimentalmente verificato come si affaccino all'attenzione del tossicologo forense una varietà di situazioni che richiedono una considerazione attenta e approfondita. Oltre ai preventivabili casi di falsa negatività in sede di screening, una possibilità di riconoscimento dei catinoni è offerta dalla reattività crociata di molti kit immunometrici per la classe delle amfetamine. Pertanto, appare necessario l'utilizzo di metodi di conferma che comprendano anche le sostanze di tipo catinonico, in modo che sia possibile identificare con certezza tutti gli stimolanti, sia di vecchia sia di nuova generazione. Al tempo stesso, anche per i catinonici, è importante verificare anamnesticamente che talune positività non siano ascrivibili al metabolismo di farmaci lecitamente assunti.

Nel caso dei cannabinoidi sintetici, data l'ampia varietà di prodotti e il loro rapido metabolismo, nella maggior parte dei casi incognito, è possibile focalizzarsi sulla ricerca delle sostanze originariamente assunte, a patto che si sviluppino procedure analitiche da applicare su matrici diverse dall'urina, quali sangue o capello, e si traggano ulteriori informazioni su ampie popolazioni di soggetti. Nella nostra ricerca, abbiamo dimostrato come una percentuale significativa di soggetti (soprattutto se di sesso maschile, di età inferiore ai 30 anni e se consumatori di prodotti derivati dalla Cannabis) che si sot-

topongono agli esami per il rilascio o il rinnovo della patente di guida, abbia avuto esperienze di uso saltuario o ripetuto di queste nuove sostanze, talora di una varietà di cannabinoidi sintetici. Appare quindi urgente che i laboratori si dotino di metodiche aggiornate che includano le NSP, in modo da rendere più efficaci gli ambiti principali di intervento della tossicologia forense.

Bibliografia

1. http://www.unodc.org/unodc/secured/wdr/wdr2013/World_Drug_Report_2013.pdf. Last access 23th July 2013
2. http://www.emcdda.europa.eu/attachelements.cfm/att_190854_EN_TDAC12001ENC_.pdf. Last access 12th February 2013
3. National Early Warning System, Dipartimento Politiche Antidroga, Ministero della Salute; www.allertadroga.it
4. Coppola M., Mondola R., Synthetic cathinones: Chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as "bath salts" or "plant food", *Toxicology Letters* 2012, 211:144-149
5. Marinetti L. J., Antonides H. M., Analysis of Synthetic Cathinones commonly found in bath salts in human performance and postmortem toxicology: method development, drug distribution and interpretation of results, *Journal of Analytical Toxicology* 2013, 37:135-146
6. Favretto D., Pascali J.P., Tagliaro F., New challenges and innovation in forensic toxicology. Focus on the "New Psychoactive Substances". *J. Chromatogr. A* 2013, 1287:84-95
7. Salomone A., Luciano C., Di Corcia D., Gerace E., Vincenti M., Hair analysis as a tool to evaluate the prevalence of synthetic cannabinoids in different populations of drug consumers, *Drug Testing and Analysis* 2014,

6:126–134

8. Swortwood M. J., Heart L., DeCaprio A. P., Cross-reactivity of designer drugs, including cathinone derivatives, in commercial enzyme-linked immunosorbent assays, *Drug Testing and Analysis* 2013, DOI: 10.1002/dta.1489

9. Salomone A., Gerace E., D'Urso F., Di Corcia D., Vincenti M., Simultaneous analysis of several synthetic cannabinoids, THC, CBD, CBN in hair by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Method validation and application to real samples. *J. Mass Spectrom.* 2012, 47:604-610

10. Hutter M., Kneisel S., Auwarter V., Neukamm M.A., Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2012, 903:95-101

11. GTFI (2012) Linee guida per i laboratori di analisi di sostanze d'abuso con finalità tossicologico-forensi e medico-legali. Gruppo Tossicologi

Forensi Italiani, Pavia

12. SOFT/AAFS (2006) Forensic toxicology laboratory guidelines. Society of Forensic Toxicologists/American Academy of Forensic Sciences, Mesa/Colorado Springs

13. Caneparo D., Borio F., Salomone A., Vincenti M. manuscript in preparation

14. Cooper G.A., Kronstrand R., Kintz P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int.* 2012, 218:20.

15. Vincenti M., Salomone A., Gerace E., Pirro V. Application Of Mass Spectrometry To Hair Analysis For Forensic Toxicological Investigations, *Mass Spectrometry Reviews* 2013, 32, 312–332

16. Kintz P. Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption. *Forensic Sci. Int.* 2012, 218: 2.