



Università Politecnica delle Marche
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche
XXX ciclo

Settore Scientifico Disciplinare MED/43

Tesi di Dottorato:

**STUDIO IN VITRO SULLA STABILITÀ STRUTTURALE
DEI CANNABINOIDI SINTETICI NEL FLUIDO ORALE**

Dottorando

Marina Di Felicianonio

Docente tutor

Prof. Raffaele Giorgetti

A.A. 2014-2017

Indice

INTRODUZIONE	5
CAPITOLO 1:	
Cannabinoidi sintetici: il dirottamento delle ricerche farmaceutiche	9
1.1 I cannabinoidi classici	14
1.1.1 Modificazioni della catena laterale al C3	15
1.1.2 Modificazioni del sostituente al C9	17
1.1.3 Modificazione al C1	18
1.1.4 Modificazioni del core	18
1.2 I cannabinoidi non classici	19
1.3 Aminoalchilindoli	21
1.4 Altre strutture	30
CAPITOLO 2:	
Dal laboratorio alla strada: l'emergenza globale dei cannabinoidi sintetici ..	33
2.1 La produzione e la distribuzione	36
2.2 Farmacotossicologia	39
2.2.1 Effetti fisici	40
2.2.2 Effetti psicoattivi	42
2.2.3 Uso cronico	43
2.3 Status legale in Italia	43

CAPITOLO 3:

Il fluido orale nella rilevazione dei cannabinoidi sintetici	49
3.1 La composizione	51
3.2 La farmacocinetica delle sostanze d'abuso	55
3.3 I cannabinoidi sintetici nel fluido orale	57

CAPITOLO 4:

Stabilità delle sostanze d'abuso	59
4.1 L'instabilità delle droghe: fattori chimici, fisici e biologici	61
4.2 Catena di custodia	63

CAPITOLO 5:

La spettrometria di massa ad alta risoluzione nelle indagini molecolari	65
5.1 La sorgente ionica	66
5.1.1 Ionizzazione elettrospray (ESI)	68
5.2 L'analizzatore di massa	72
5.2.1 Analizzatore a tempo di volo (TOF)	73
5.3 Spettro di massa ESI-TOF	75

CAPITOLO 6:

Fase Sperimentale	77
6.1 Materiali	78
6.1.1 Composti chimici e reagenti	78

6.2 Metodi	79
6.2.1 Classificazione chimico-strutturale	79
6.2.2 Studio di stabilità strutturale	79
6.2.3 Homemade cigarette-smoking machine	80
6.2.4 Preparazione analitica del fluido orale	81
6.2.5 HPLC-ESI-TOF	82
6.3 Validazione del dato	84
 CAPITOLO 7:	
Risultati e discussioni	87
7.1 Ottimizzazione del metodo analitico-strumentale	96
7.1.1 Spettro di massa ESI ⁺ -TOF di MO-CHMINACA	100
7.2 Validazione del dato	102
7.2.1 Selettività	102
7.2.2 Effetto matrice	102
7.2.3 Sensibilità del metodo: limite di rilevabilità e di quantificazione (LOD e LOQ)	103
7.2.4 Carry over	103
7.3 Stabilità dei cannabinoidi sintetici nel fluido orale in seguito a catena di custodia t ₁₀ RT, t ₁₀ 4°C, t ₁₀ , -20°C	104
7.3.1 Studi computazionali di stabilità dei cannabinoidi sintetici	106
7.3.2 Stabilità delle molecole: ruolo del contenitore di raccolta	109

CONCLUSIONI	111
PROSPETTIVE FUTURE	114
BIBLIOGRAFIA	117
RINGRAZIAMENTI	135

INTRODUZIONE

Introduzione

Nell'ultimo decennio, nel mondo è avvenuto un mutamento del mercato clandestino segnato dalla comparsa di sostanze d'abuso alternative e molto più pericolose delle droghe tradizionali. Sostanze d'abuso come la cocaina, l'eroina e le amfetamine, altamente diffuse negli anni passati a livello mondiale, sono state rimpiazzate da altre tipologie di droghe prevalentemente di sintesi (*Designer Drugs*). Tra le numerose classi di queste “(Nuove) Sostanze Psicoattive” (NPS), la fetta più ampia appartiene ai cosiddetti cannabinoidi di sintesi, la cui recente diffusione ha aggiunto una nuova dimensione al mercato della Cannabis.

I cannabinoidi sintetici rappresentano un'ampia e diversificata classe di molecole ad attività cannabimimetica soggetti, nel corso degli anni, ad una tale trasformazione dal punto di vista chimico-strutturale, per cui le molecole di ultima generazione hanno perso qualsiasi impronta tipica dei cannabinoidi sintetici inizialmente apparsi nel mercato clandestino. A partire dal 2008, anno in cui queste molecole furono per la prima volta rilevate analiticamente in miscele vegetali denominate “*Spice*”, lo sviluppo di tecniche analitico-strumentali atte alla loro identificazione nelle matrici biologiche hanno acquisito sempre più maggiore importanza nel campo della tossicologia per scopi clinici e forensi. È chiaro che lo screening di queste sostanze implica la ricerca di un numero elevato di molecole altamente diversificate tra loro dal punto di vista strutturale e pertanto rappresentano una vera e propria sfida per i laboratori di Tossicologia Clinica e Forense, a cui è richiesto un costante aggiornamento sotto il profilo analitico-strumentale. L'immissione sul mercato clandestino di nuove molecole di sintesi è così rapida che, la carenza di studi farmacotossicologici e farmacocinetici, richiede l'impiego di metodi analitici innovativi e la cromatografia liquida con rivelatore di massa ad alta

risoluzione risulta fondamentale al fine di indagare nei campioni biologici la presenza dei cannabinoidi sintetici, e in generale delle NPS.

Nello sviluppo di un metodo analitico nulla deve essere trascurato sotto il profilo analitico procedurale e, in particolare, il mantenimento dell'integrità del campione al momento del prelievo deve essere un requisito fondamentale al fine di impedire l'alterazione dell'analita. La possibilità di eseguire l'identificazione e quantificazione del principio attivo d'interesse, dipendono perciò dalla corretta catena di custodia del campione da analizzare. Numerosi fattori tra cui le proprietà fisico-chimiche della droga, la natura della matrice biologica, la procedura di raccolta del campione, l'uso di additivi, fattori esterni, etc. possono più o meno contribuire all'alterazione dell'analita.

Sebbene i cannabinoidi sintetici siano stati intensivamente investigati e identificati negli ultimi anni, dati che attestino la loro stabilità nelle matrici biologiche sono scarsi e in molti casi assenti. Inoltre, la dinamicità con cui i cannabinoidi sintetici vengono introdotti nel mercato nero e la diversità chimico-strutturale che li caratterizza, richiede necessariamente all'analista la suddivisione in classi e lo sviluppo di protocolli analitici utilizzabili anche con le nuove molecole che periodicamente si aggiungono a quelle già note alle autorità. Lo studio si propone come obiettivo lo sviluppo di un protocollo analitico per l'identificazione quali/quantitativa dei cannabinoidi sintetici nel fluido orale e la valutazione della loro stabilità in questa matrice, al fine di ottimizzare il processo analitico-strumentale da cui dipende imprescindibilmente l'attendibilità del dato analitico.

CAPITOLO 1

CANNABINOIDI SINTETICI: IL DIROTTAMENTO DELLE
RICERCHE FARMACEUTICHE

Cannabinoidi sintetici: il dirottamento delle ricerche farmaceutiche

Il termine “droga” è oggi sinonimo di sostanza stupefacente, spesso associato a molecole chimiche farmacologicamente attive dotate di attività psicotropa. Le droghe, in realtà, fanno parte da sempre della storia dell’umanità: in passato l’assunzione di sostanze naturali rappresentava una parte fondamentale del rapporto con le divinità, un collegamento con la medicina, una connessione con il proprio corpo. La presenza di molecole bioattive in piante o funghi sono il risultato di una co-evoluzione tra regno botanico e regno animale, biosintetizzate al fine di contrastare l’attacco da parte degli animali e conservate inalterate nel corso del tempo.

Tra le tante conosciute, la canapa, ha avuto un ruolo importante nella storia. L’utilizzo delle costituenti di questa pianta (marijuana, hashish) per scopi terapeutici e/o religiosi può essere ricondotto all’antica Cina (2737 a.C.): l’imperatore cinese Shen-Nung, uno dei padri della medicina cinese fu il primo a parlarne dei benefici, notando le sue proprietà contro la malaria e i reumatismi, la gotta, etc.

La diffusione in Europa e l’introduzione nella medicina occidentale, accompagnate dai numerosi studi scientifici circa il suo utilizzo medico, ne determinarono nel 1854 l’entrata nel dispensario farmaceutico degli Stati Uniti come medicinale di uso comune nella pratica clinica, i cui impieghi terapeutici erano soprattutto in relazione con la sua attività analgesica. L’uso della Cannabis in medicina è iniziato a calare, alla fine del XIX secolo, a causa della difficoltà di controllarne i dosaggi e dell’aumento dell’interesse verso i farmaci sintetici. La storia della canapa come farmaco si chiuse bruscamente nel 1937 con l’approvazione della *Marihuana Tax Act* che ne determinò la cancellazione prima dalla farmacopea ufficiale americana seguita dalle altre nazioni.

L'interesse della comunità scientifica nei confronti della marijuana ha atteso secoli dopo, quando nel 1964 Dr. Raphael Mechoulam isolò ed identificò il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC) come il principale costituente psicoattivo della pianta di Cannabis ^[1]. A partire dagli anni '90 iniziarono le grandi scoperte scientifiche sui meccanismi di azione dei cannabinoidi naturali, specialmente grazie al perfezionamento delle tecniche separative, spettroscopiche, e delle metodologie di sintesi organica.

La marijuana contiene più di 400 sostanze, di cui 66 possiedono una caratteristica struttura terpenofenolica ^[2,3]. Il cannabinoide predominante, e responsabile della maggior parte degli effetti psicoattivi tipici della Cannabis è il Δ^9 -THC (Figura 1).

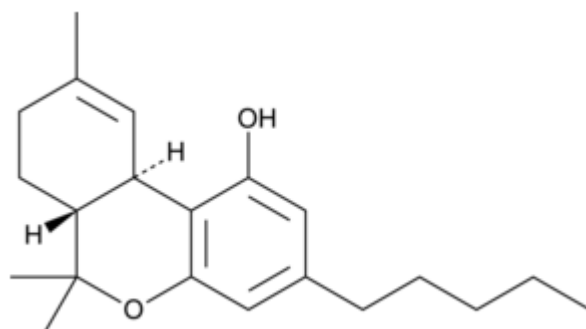


Figura 1: Struttura molecolare del Delta-9-tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC), fitocannabinoide caratterizzato da un tipico core dibenzopirano.

La maggioranza degli altri cannabinoidi non manifestano effetti psichici significativi ma possono variamente interagire con il Δ^9 -THC aumentandone o decrementandone la potenza ^[4].

A causa dell'alta lipofilia dei cannabinoidi naturali, per molto tempo fu creduto che il loro meccanismo di azione risiedesse nella capacità di stabilire interazioni aspecifiche con i lipidi di membrana, alterandone così la fluidità. Tuttavia, l'osservazione che tali molecole possedevano una certa

stereoselettività, come evidenziato dalla forte perdita di potenza degli enantiomeri del Δ^9 -THC in svariati test comportamentali, rendeva plausibile l'ipotesi di un'interazione specifica [5,6]. Solo negli anni '90 si arrivò all'identificazione ed al clonaggio dei recettori dei cannabinoidi CB₁ e CB₂ [7-9]. I primi sono espressi principalmente nel sistema nervoso centrale, ove sono ampiamente distribuiti, ma sono localizzati anche in alcuni tessuti periferici; i secondi sono espressi principalmente sulle cellule del sistema immunitario ed esibiscono il 48% di omologia con i recettori CB₁. Ci sono evidenze della presenza di sottotipi dei recettori dei Cannabinoidi [10].

A ciò è seguita la scoperta del cosiddetto sistema endocannabinoide nell'organismo dei mammiferi, incluso l'uomo, e di mediatori lipidici endogeni che fungono da ligandi naturali per i recettori [11-13]. Si tratta delle anandamidi, sostanze messaggere prodotte dal corpo umano, che agiscono in maniera del tutto analoga ai cannabinoidi presenti nella Cannabis e che hanno un importante ruolo nella rielaborazione delle percezioni sensoriali, e in particolare nei dolori, nella nascita dei sentimenti, nella memoria e nel coordinamento motorio. Da qui, numerosi libri e pubblicazioni scientifiche iniziarono a testimoniare a favore della cannabis nella cura di patologie che vanno dai dolori muscolo-scheletrici, al glaucoma, dall'anoressia e depressione a gravi malattie come l'epilessia e la sclerosi multipla, per non parlare del validissimo aiuto nell'alleviamento degli effetti secondari dei trattamenti chemioterapici nel cancro, come nausea e vomito, e negli stati debilitanti della Sindrome da Immunodeficienza (AIDS) [14-17].

La rivalutazione della canapa e del suo potenziale terapeutico ha suscitato l'attenzione delle corporazioni chimico-farmaceutiche e il loro coinvolgimento nella progettazione e sintesi di molecole, in grado di emulare, dal punto di vista terapeutico, il principio attivo della cannabis, il

Δ^9 -THC. L'obiettivo era quello di produrre dei derivati sintetici molto più potenti dei relativi principi attivi naturali sotto il profilo medico, in cui la dose poteva essere standardizzata e l'attività psicotropa, che va ad urtare con la terapeuticità di tale principio, eliminata.

Come documentato dalla vasta letteratura scientifica, sebbene i centri di ricerca si siano concentrati sullo sviluppo di molecole agoniste dei recettori dei cannabinoidi CB_2 presenti nel sistema immunitario, o dei recettori CB_1 periferici, quindi non in grado di penetrare la barriera ematoencefalica, le numerose strutture testate preservavano l'affinità recettoriale nei confronti di entrambi, compresi i CB_1 centrali localizzati sull'encefalo. La loro capacità di interazione con i medesimi recettori del Δ^9 -THC rendeva di fatto queste molecole, mai progredite in fase di sviluppo farmaceutico, dei potenziali sostituti della cannabis pur possedendo una struttura chimica totalmente differente dalla stessa.

Oggi il termine “cannabinoidi” include non solo tutti i fitocannabinoidi e gli endocannabinoidi, ma anche tutti i numerosi prodotti di sintesi sviluppati nel corso degli ultimi 40 anni dalle industrie farmaceutiche. La caratteristica che permette di accomunare queste tre famiglie di composti chimici è la loro affinità, sebbene in misura diversa, per i medesimi recettori, i recettori dei cannabinoidi. Anche se questi analoghi di sintesi sono ormai divenuti popolari con il termine “cannabinoidi sintetici”, la maggior parte di essi non risultano strutturalmente correlati con i cannabinoidi naturali. Al contrario, costituiscono un gruppo talmente eterogeneo dal punto di vista chimico-strutturale che rende i termini “agonisti dei recettori dei cannabinoidi” o “cannabimimetici” le denominazioni più appropriate.

1.1) I cannabinoidi classici

Il termine cannabinoidi classici è utilizzato per descrivere dei modulatori dei recettori dei cannabinoidi strutturalmente correlati al Δ^9 -THC, caratterizzati dal tipico core triciclico dibenzopirano, e sviluppati a partire dagli anni '60 [18]. Sebbene numerosi altri tipi strutturali di agonisti dei recettori dei cannabinoidi siano stati sviluppati più recentemente, i cannabinoidi classici rappresentano il gruppo di gran lunga più estensivamente studiato in termini di SAR (*Structure-Activity Relationship*) e farmacologia.

L'affinità dei cannabinoidi classici per i recettori CB₁ risulta correlata con la depressione dell'attività spontanea e la produzione di antinocicezione, ipotermia, catalessia nel topo, e con l'attività psicomimetica nell'uomo. In diversi casi, comunque, vi erano delle differenze inaspettate tra i trend osservati nell'affinità di legame e i trend nell'attività nei modelli comportamentali murini. Questo potrebbe indicare differenze di efficacia tra agonisti pieni, agonisti parziali e antagonisti/agonisti inversi, o potrebbe riflettere differenze nel metabolismo in vivo o nella penetrazione della barriera ematoencefalica o una combinazione di questi fattori.

Tre elementi farmacoforici attorno il template del cannabinoide naturale Δ^9 -THC hanno mostrato essere importanti per il binding recettoriale al CB₁ e la sua attivazione (Figura 2) [19-21]:

- 1) la catena laterale idrocarburica al C₃;
- 2) il sostituito al C₉;
- 3) il gruppo ossidrilico sul fenolo al C₁.

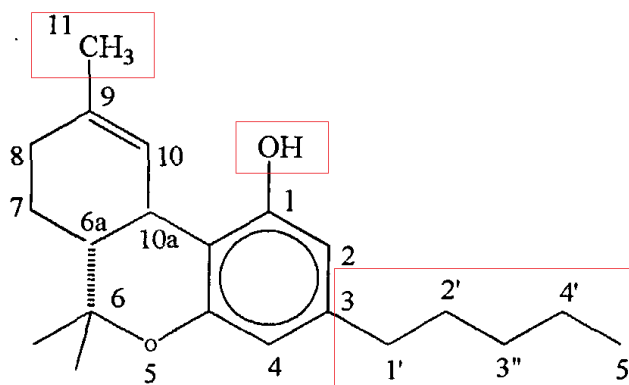
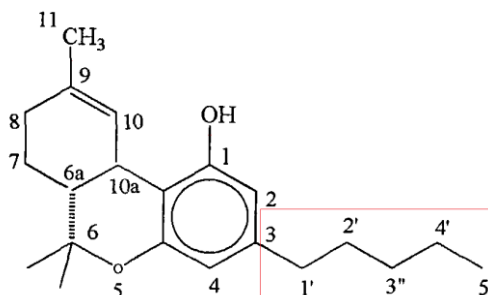


Figura 2: Rappresentazione del Δ^9 -THC: i riquadri evidenziano i siti molecolari coinvolti nell'interazione recettoriale: il gruppo metilico al C₉, il gruppo idrossilico al C₁ e la catena alchilica al C₃.

Sulla base di tali conoscenze, e utilizzando la molecola del Δ^9 -THC come template, iniziò la sintesi di nuovi composti strutturalmente correlati. In questi studi preliminari era utilizzata come misura standard dell'attività psicoattiva cannabinoide il test dell'atassia nel cane.

1.1.1) Modificazioni della catena laterale al C₃



Adam & co-workers dimostrarono che la catena laterale 1',2'-DMH (1',2'-dimetileptile) era il sostituente 3-alchilico ottimale per l'attività cannabinoide in vivo nella serie Δ^{6A-10A} -THC [22]. Come evidenziato da studi in letteratura, l'affinità di legame degli analoghi sviluppati aumentava, infatti, con l'aumentare della lunghezza della catena laterale, da butile a ottile, e sostituenti metilici nelle posizioni 1'- e 2'- della catena laterale apportavano effetti benefici sull'affinità recettoriale al CB₁ e sulla potenza in vivo. L'affinità di interazione recettoriale era però ridotta nei

composti con una catena laterale più lunga di 8 atomi di carbonio con sostituzione 1',1'-dimetilica, e i rispettivi composti mostravano una ridotta o persino assente attività in vivo [23].

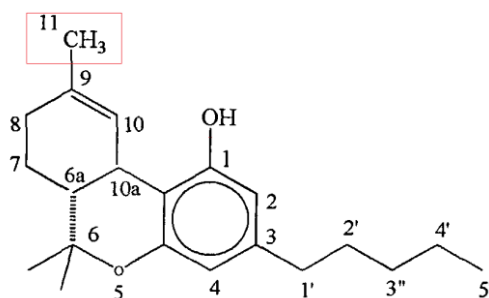
Composti con catene laterali conformazionalmente ristrette, insature e aromatiche, sono state sintetizzate con lo scopo di meglio definire le caratteristiche steriche del sito di legame nella regione della catena laterale. Fu postulato che per l'ottenimento di una potenza ottimale, la catena laterale doveva possedere una lunghezza e una flessibilità appropriate, che le permettevano di ripiegarsi in modo che la sua estremità terminale era in prossimità dell'anello fenolico, piuttosto che in una conformazione estesa [24].

Sono stati introdotti un ampio range di gruppi funzionali nella posizione 1' della catena laterale C₃. I gruppi funzionali maggiormente tollerati erano gruppi lipofili come metili o ditilani, rispetto ai gruppi polari come alcoli e chetoni.

Gruppi funzionali alogeni, ciano, acidi carbossilici e ammidici sono stati introdotti all'estremità terminale della catena laterale C₃. Quest'area della molecola sembrava essere tollerante a sia gruppi lipofili sia gruppi più polari. La sostituzione alogena al carbonio terminale della catena laterale, in particolare, portava ad un aumento dell'affinità, in cui alogeni ingombranti, come bromo e iodio, producevano i maggiori effetti [25].

In generale, però, erano le modificazioni combinate che tendevano a rinforzare il trend SAR osservato per le modificazioni individuali.

1.1.2) Modificazioni del sostituito al C₉



Uno dei composti di questo gruppo, l'11-idrossi-1',1'-DMH Δ^8 -THC (HU-210) è stato sintetizzato sulle basi della via metabolica principale del Δ^9 -THC, in cui l'ossidazione in posizione C₉ del tetraidrocannabinolo porta alla formazione di metaboliti idrossilati, biologicamente attivi, in quanto potenti agonisti al CB₁ con un profilo farmacologico simile a quello del composto parentale.

HU-210 è risultato un agonista estremamente potente dei cannabinoidi (dalle 100-800 volte più potente del cannabinoide naturale), ampiamente utilizzato come strumento farmacologico (Figura 3) [26].

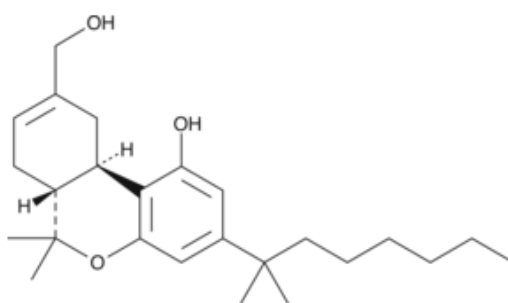
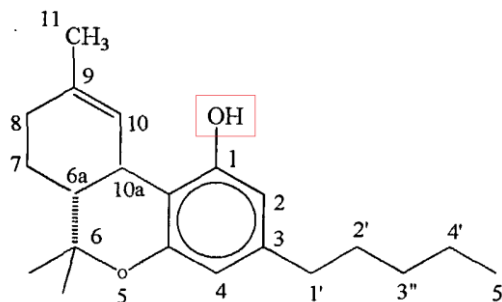


Figura 3: Struttura molecolare del composto HU-210, caratterizzato dalla presenza di un gruppo ossidrilico in posizione C₁₁ e da una catena 1',1'-dimetileptilica.

Questo composto è stato per la prima volta sintetizzato dal gruppo di ricerca del Prof. R. Mechoulam nel 1988 dell'Hebrew University di Gerusalemme. Ricerche scientifiche hanno mostrato la sua implicazione nella prevenzione dell'infiammazione causata dalle proteine beta-amiloidi

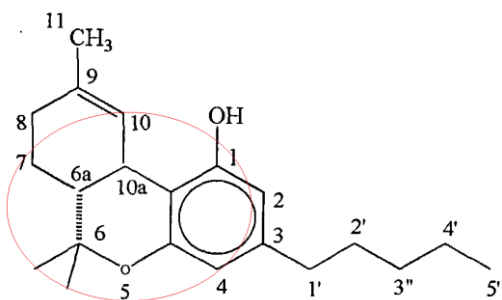
coinvolte nell'Alzheimer, oltre che nella prevenzione dei danneggiamenti cognitivi [27].

1.1.3) Modificazioni al C₁



In generale, la modifica o la delezione del gruppo idrossifenolico al C₁ portava ad una affinità recettoriale al CB₁ significativamente ridotta, anche se analoghi del Δ^8 -THC 1-deossi e 1-alcossi si sono rivelati essere ligandi selettivi per i recettori CB₂.

1.1.4) Modificazioni del core



Ci sono limitati esempi in letteratura dove sostituenti sono stati introdotti in altre posizioni del core tricyclico. Sostituzioni nella posizione C₂ dell'anello arile producevano una riduzione dell'affinità recettoriale. Studi di modellistica molecolare suggerirono che questo fenomeno potrebbe essere attribuito sia ad una riduzione drammatica della densità elettronica attorno

al gruppo idrossile fenolico e l'ossigeno del gruppo pirano, sia a causa di interazioni steriche sfavorevoli nel sito di legame recettoriale.

1.2) I cannabinoidi non classici

Nei primi anni '80, un gruppo di ricercatori della Pfizer, esplorando lo studio di potenziali analgesici, hanno sviluppato un potente cannabimimetico: il 9-nor-9 β -hydroxyhexahydrocannabinol (HHC), il primo potente analogo del Δ^9 -THC, che esercitava effetti analgesici in misura maggiore rispetto ad altri effetti e che ha fornito uno dei punti di partenza nel tentativo di delineare i requisiti minimi strutturali per gli effetti analgesici dei cannabinoidi sintetici (Figura 4).

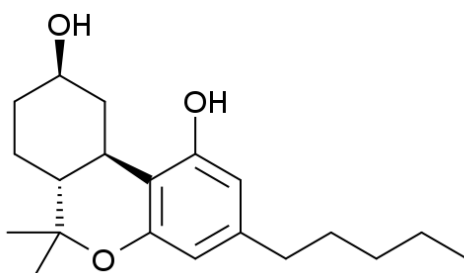


Figura 4: Struttura molecolare del composto HHC.

HHC ha rappresentato il cannabinoide sintetico originale da cui hanno avuto origine i cannabinoidi della serie CP (dall'acronimo “*Charles Pfizer*”), caratterizzati da una tipica struttura biciclica. Questi composti, definiti “cannabinoidi non classici” mancano dell'anello pirano tipico dei cannabinoidi classici risultando in strutture più semplificate [28]. Dati sperimentali basati su studi SAR dimostravano che l'assenza del sistema tricyclico benzopirano tipico del Δ^9 -THC non eliminava l'attività di binding recettoriale dei cicloesilfenoli; inoltre, sostituendo l'ossigeno del gruppo pirano con un azoto l'attività veniva preservata, significando che questo

gruppo non era fondamentale nell'interazione recettoriale. Studi SAR condotti sul Δ^9 -THC avevano in precedenza permesso di ipotizzare che l'ossigeno del gruppo fenolico interagisse con il recettore CB₁ attraverso un legame idrogeno con un residuo di lisina dello stesso (Lys 192), ma che il punto essenziale per il binding recettoriale era la catena alchilica associata all'anello aromatico. Il primo cannabinoide sintetico non classico, sintetizzato sulla base delle seguenti osservazioni, è stato CP 47,497, caratterizzato da una potente azione antinociceptiva e quindi presto proposto come nuovo analgesico prototipo (Figura 5) ^[29].

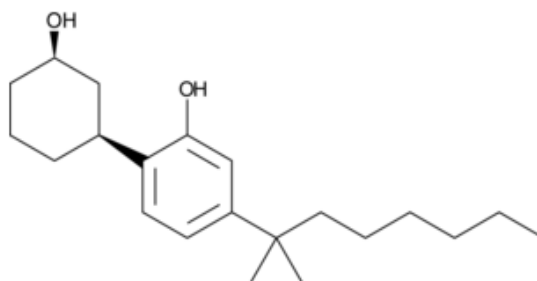


Figura 5: Struttura molecolare del composto CP 47,497, caratterizzato da una tipica struttura biciclica, priva dell'anello pirano del Δ^9 -THC.

Sulla base della struttura del CP 47,497 sono stati sintetizzati una grande varietà di analoghi a struttura cicloesilfenolica, al fine di definire il farmacoforo responsabile dell'azione antinociceptiva.

I cannabinoide non classici preservano i tre principali elementi farmacoforici dei cannabinoide classici e la SAR in queste regioni risultava parallela a quella di cannabinoide classici ^[30]. Un quarto importante elemento farmacoforico stabilito per la serie dei cannabinoide non classici si è rivelato essere un gruppo alifatico idrossilico a sud della struttura molecolare. L'aggiunta di questo gruppo portò alla sintesi di un composto pienamente agonista dei CB₁ e CB₂, il CP 55,940, utilizzato anche per dimostrare i siti di legame nel cervello (Figura 6) ^[31].

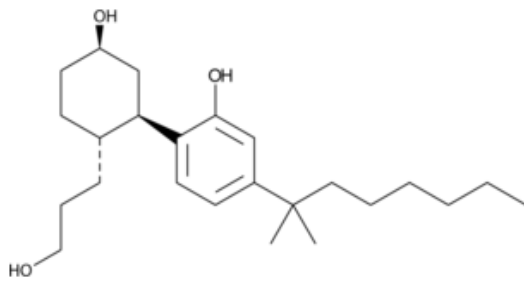


Figura 6: Struttura molecolare del composto CP 55,940, cannabinoide sintetico biciclico con gruppo alifatico idrossilico a sud della molecola.

Melvin et al. dimostrarono che il posizionamento di questa catena alifatica era critica per un legame ottimale. L'analogo costretto di CP 55,940, (-)-CP 55,244 mostrava un'affinità di legame veramente alta per CB₁: per questo composto è stato suggerito che l'elevata capacità di binding recettoriale era legata alla capacità della molecola di formare legami idrogeno intramolecolari tra il gruppo idrossilico fenolico e il gruppo idrossilico della catena alifatica.

1.3) Aminoalchilindoli

Analogamente ai cannabinoidi sintetici classici e non classici, anche gli indolo-derivati sono stati originariamente sintetizzati per scopi di ricerca. Oggi sono anche i componenti chimici psicoattivi più comunemente identificati nei prodotti etichettati come “*herbal incense*”.

JWH-018 (IUPAC: 1-pentyl-3-(1-naphthoyl)indole), uno dei primi composti identificati in un caso forense, e altri cannabinoidi sintetici strutturalmente correlati, furono progettati come parte di un programma di ricerca diretto dal Dr. John Wiley Huffman nell'Università di Clemson, nel South Carolina.

La prima classe di nuovi agonisti dei cannabinoidi (quelli non derivati dal Δ⁹-THC) è stata scoperta accidentalmente dal gruppo di ricerca Sterling-Winthrop durante lo studio di analoghi conformazionalmente costretti della pravadolina (WIN48,098) (Figura 7) ^[32].

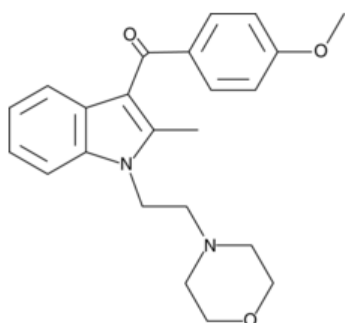


Figura 7: Struttura molecolare del composto Pravadolina (WIN48,098), composto precursore degli aminoalchilindoli.

Questi analoghi della pravadolina mostravano una ridotta abilità di comportamento come agenti anti-infiammatori non steroidei che inibiscono la ciclossigenasi ma possedevano una buona capacità di legame con i recettori CB₁. In questo studio iniziale i ricercatori trovarono che rimpiazzando l'anello 4-metossi-fenil della pravadolina con altri anelli aromatici, come l'anello 1-naftile, l'affinità ai CB aumentava. Un composto di particolare importanza sintetizzato allora era WIN 55,212-2, un potente agonista di entrambi i recettori CB₁ e CB₂, che rappresentò il cannabinoide prototipico aminoalchilindolo che ispirò l'idea dei cannabinoidi sintetici di natura indolica (Figura 8) ^[33].

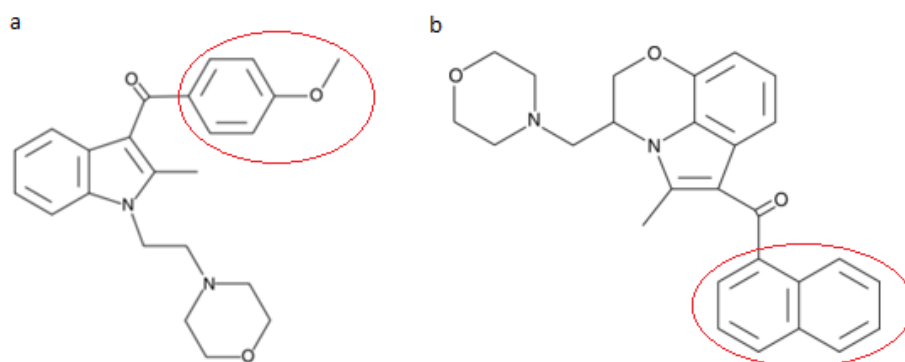


Figura 8: Struttura molecolare di WIN 55,212-2 (b), composto sintetico derivante dalla pravadolina (a), per sostituzione del gruppo metossi-fenolico con un gruppo naftile (in rosso nei cerchi)

Mentre il Δ^9 -THC lega con un'affinità approssimativamente uguale entrambi i recettori dei cannabinoidi (CB₁ K_i = 41 nM, CB₂ K_i = 36 nM), WIN 55,212-2 presentava una maggiore affinità per CB₂ (K_i = 0,28 nM) rispetto al CB₁ (K_i = 1,89 nM) ^[34]. Sebbene questo composto non fu

sviluppato come farmaco, è stato ampiamente utilizzato come strumento farmacologico nella ricerca dei cannabinoidi.

Con lo scopo di determinare il modo in cui molecole strutturalmente diverse come il Δ^9 -THC e il WIN55,212-2 condividessero la proprietà di attivazione del medesimo recettore e al fine di razionalizzare i risultati SAR ottenuti, Huffman e collaboratori proposero il cosiddetto “*Modello farmacoforico di attacco a tre punti*” nell’interazione tra ligando cannabinoide-recettore ed ipotizzarono che la localizzazione di attacco per il gruppo morfolino e l’ossigeno chetonico (3 e 2 in Figura 9b) di WIN 55,212-2 corrispondevano rispettivamente alla catena laterale e all’idrossile fenolico del Δ^9 -THC (3 e 2 in Figura 9a) [35]. In questo arrangiamento, la porzione naftoilindolica degli AAI sarebbe sovrapposta al cicloesile e l’anello pirano tipico dei cannabinoidi classici.

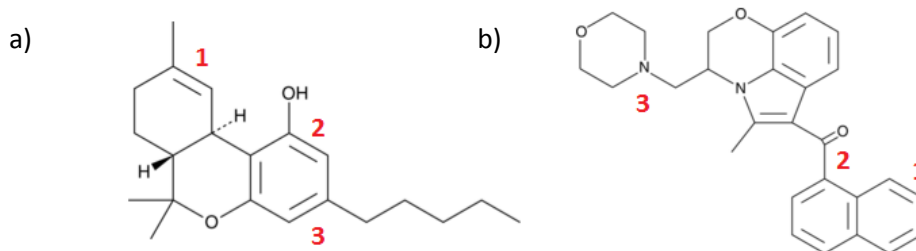


Figura 9: Strutture molecolari dei composti Δ^9 -THC (a) e WIN 55,212-2 (b). In figura sono evidenziate le regioni che, in entrambe le molecole, corrispondono allo stesso sito di legame a livello recettoriale

Con lo scopo di valutare l’ipotesi che il gruppo morfolino dell’aminoalchilindolo e la catena laterale al C₃ del Δ^9 -THC occupassero lo stesso dominio spaziale all’interno del recettore CB₁, Huffman designò e sintetizzò una nuova serie di cannabinoidi sintetici indolo -derivati in cui la catena aminoalchiletica, tipica di WIN, era rimpiazzata con altri sostituenti, in particolare da una catena idrocarburica. In collaborazione con il gruppo di ricerca del Dr. B. Martin dell’Università Commonwealth della

Virginia fu condotta l'analisi SAR (*Structure-Activity Relationship*) su queste strutture valutando:

- 1) l'affinità recettoriale al CB₁ e CB₂;
- 2) l'attività in vivo (test della tetraide degli effetti cannabimimetici) [36].

Uno dei primi riscontri degli studi fu che il gruppo amminico ciclico tipico di WIN 55,212-2 non era necessario per la psicoattività.

La sostituzione di questo gruppo con un gruppo n-pentilico risultò in un composto (JWH-018) caratterizzato da una buona affinità recettoriale per il CB₁ (K_i = 9 nM) e corrispondentemente una buona potenza nei test della tetraide (Figura 10) [37].

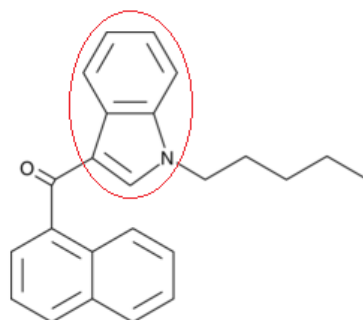


Figura 10: Struttura molecolare del cannabinoide sintetico JWH-018. Nel cerchio è evidenziato il gruppo indolico, da cui il nome del gruppo *Aminoalchilindoli*.

Inoltre, l'affinità e la potenza variavano sistematicamente con l'aumentare della lunghezza della catena carboniosa, con un optimum di attività dalla n-butilica alla n-esilica e assenza o riduzione del binding recettoriale con catene carboniose più corte o più lunghe [38]. Questa caratteristica trovava corrispondenza con il risultato dell'analisi sulla struttura-attività dei cannabinoidi classici e biciclici, in cui la lunghezza e la ramificazione della catena al carbonio C₃ della catena del Δ⁸-THC e dell'analogo CP 55,940 influiva notevolmente sull'affinità al CB₁ e sulla potenza in vivo [39]. Tra le modificazioni strutturali apportate a livello della catena alchilica, le sostituzioni fluoropentiliche apportavano una elevata affinità recettoriale

CB₁ e CB₂: il cannabinoide di sintesi AM2201, ampiamente trovato negli *herbal incense*, presenta un'attività agonista sui recettori dei cannabinoidi pari, rispettivamente, a $K_i = 1.0$ nM per il CB₁ e 2.6 nM per il CB₂, dunque molto maggiore rispetto al suo analogo non alogenato JWH-018, caratterizzato da $K_i = 9$ nM per il CB₁ e 2.9 nM per il CB₂ (Figura 11) [40].

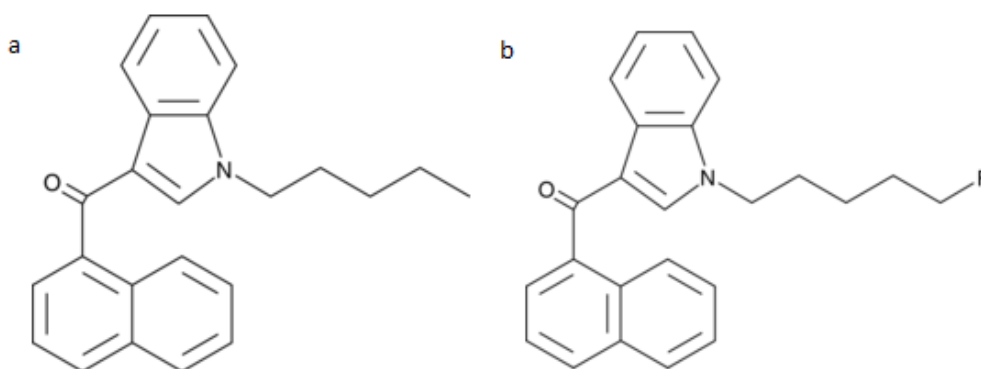


Figura 11: Struttura molecolare dell'aminoalchilindolo AM2201 (b), ampiamente riscontrato negli *herbal incense*. Chimicamente è strutturalmente correlato al JWH-018, da cui differisce solo per la presenza dell'alogeno (F) in posizione terminale alla catena alchilica.

L'identificazione in campioni acquistati nel 2011 negli Stati Uniti degli aminoalchilindoli JWH-073, JWH-018, JWH-019, AM-2201, caratterizzati rispettivamente da sostituzioni n-butiliche, n-pentiliche, n-esiliche, fluoro-pentiliche della catena laterale, suggerisce che i produttori di queste sostanze per scopi illeciti siano orientati dagli studi scientifici pubblicati e presenti in rete [41].

L'ampio raggruppamento degli aminoalchilindoli incorpora diverse sottoclassi, diversificate dalla tipologia di gruppi chimici con cui l'indolo è sostituito. Nell'aminoalchilindolo capostipite JWH-018, è possibile riconoscere 4 sub-strutture, come evidenziato in Figura 12.

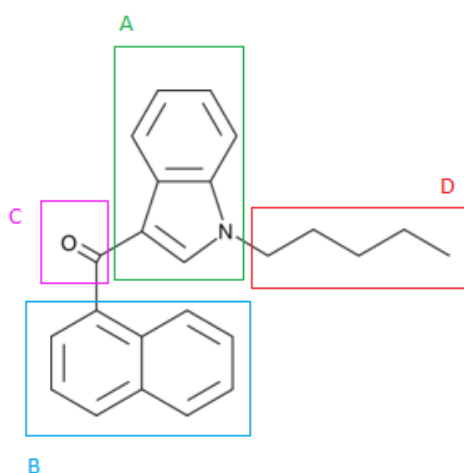


Figura 12: Sub-strutture individuabili in JWH-018: core (A); struttura secondaria (B); linker group (C); coda (D).

In generale, gli aminoalchilindoli sono caratterizzati da:

- Core: gruppo indolico;
- Struttura secondaria (Figura 13);

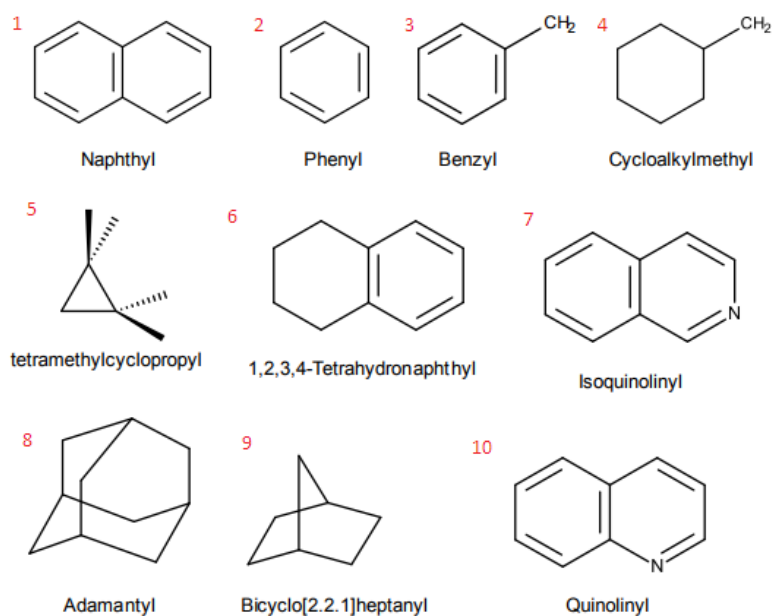


Figura 13: Strutture secondarie più comunemente riscontrate negli AAI.

Linker group: metanone ($C=O$), etanone ($C=OCH_2$), carbossammide ($C=ONH$), carbossilato ($C=OO$), metilene (CH_2);

Coda: idrocarburi saturi aciclici o idrocarburi insaturi aciclici, lineari o ramificati; strutture cicliche (Figura 14).

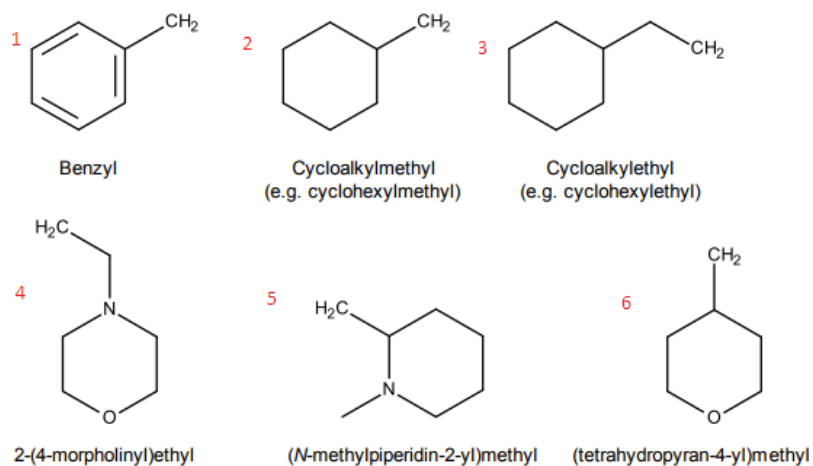
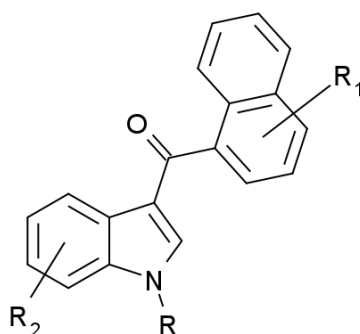


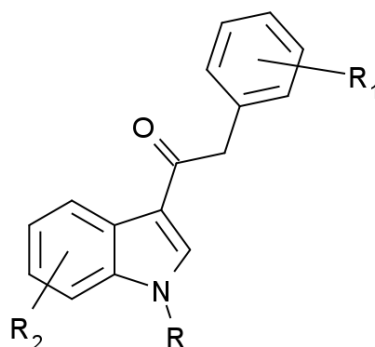
Figura 14: Linker group a struttura ciclica comunemente riscontrati negli AAI.
Sulla base di quanto sopra scritto, gli aminoalchilindoli possono essere classificati in:

- *Naftoilindoli:*



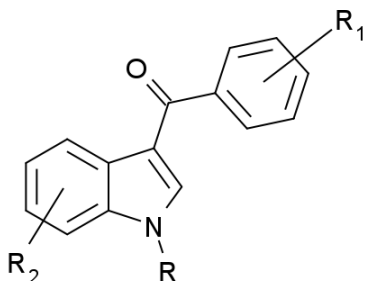
Qualsiasi composto contenente una struttura del tipo **3-(1-naphthoyl)indole**.

- *Fenilacetilindoli:*



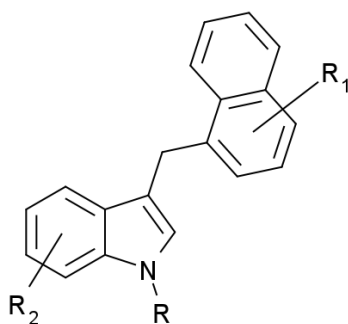
Qualsiasi composto contenente una struttura del tipo **3-phenylacetylindole**.

- *Benzoilindoli:*



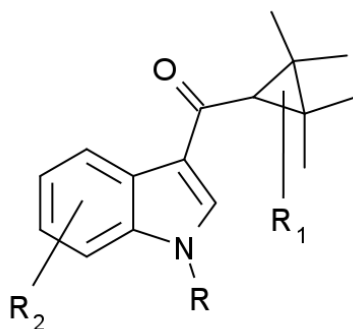
Qualsiasi composto contenente una struttura del tipo **3-(benzoyl)indole**.

- *Naftilmetilindoli:*



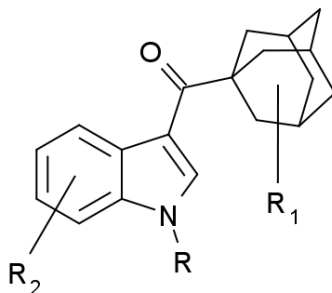
Qualsiasi composto contenente una struttura del tipo **1H-indol-3-yl-(1-naphthyl)methane**.

- *Tetrametilciclopropanoilindoli:*



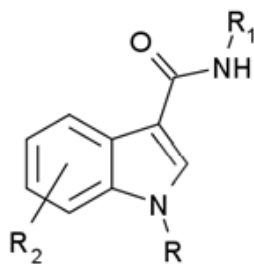
Qualsiasi composto contenente una struttura del tipo **3-(1-tetramethylcyclopropoyl)indole**.

- *Adamantolindoli:*



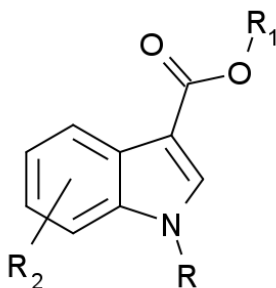
Qualsiasi composto contenente una struttura del tipo **3-(1-adamantohyl)indole**.

- *Indolo-3-carbossammide:*



Qualsiasi composto contenente una struttura del tipo **1H-indole-3-carboxamide**.

- *Esteri indolo-3-carbossilati:*



Qualsiasi composto contenente una struttura del tipo **1H-indole-3-carboxylate ester**.

1.4) Altre strutture

Cannabinoidi di sintesi, la cui struttura non è riconducibile a quella degli aminoalchilindoli, sono stati prodotti sostituendo il gruppo indolico (core) con altri anelli aromatici (figura 15).

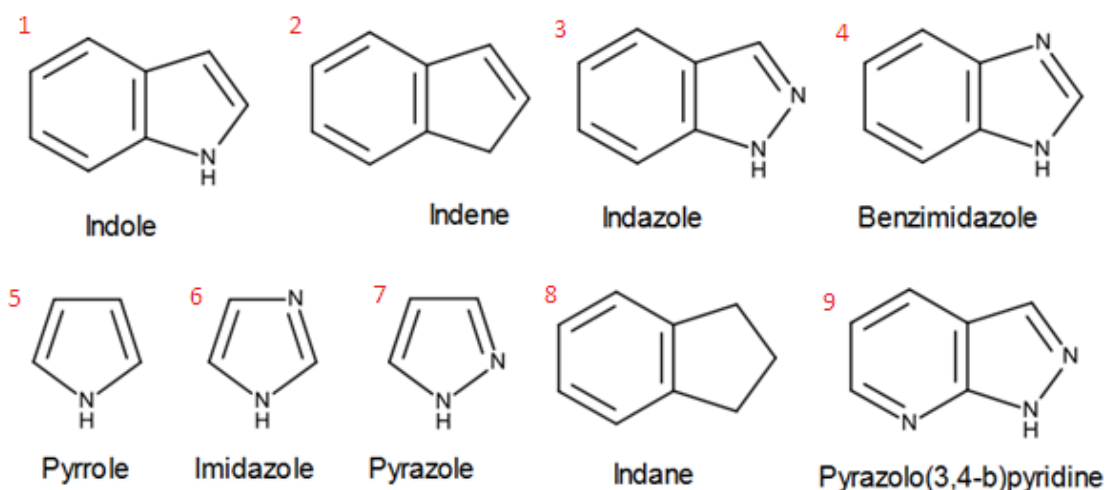
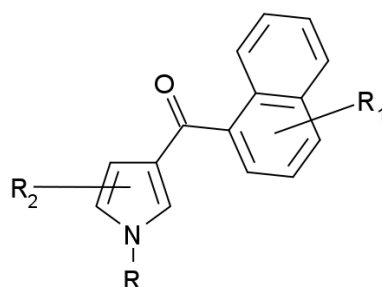


Figura 15: Tipiche strutture core caratteristiche dei cannabinoidi sintetici.

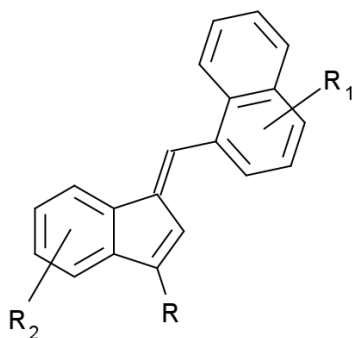
Di conseguenza, altre strutture diverse dagli aminoalchilindoli possono essere classificate come segue:

- *Naftoilpirroli:*



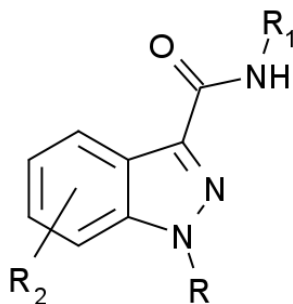
Qualsiasi composto contenente una struttura del tipo **3-(1-naphthoyl)pirrole**.

- *Naftilmetilindeni:*



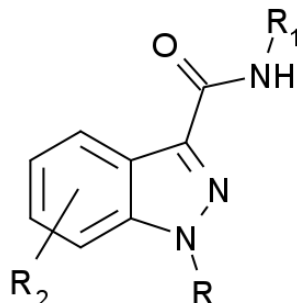
Qualsiasi composto contenente una struttura del tipo **1-(1-naphthylmethyl)indene**.

- *Indazolo-3-carbossammide:*



Qualsiasi composto contenente una struttura del tipo **1H-indazole-3-carboxamide**.

- *Esteri indazolo-3-carbossilati:*



Qualsiasi composto contenente una struttura del tipo **1H-indazole-3-carboxylate ester**.

CAPITOLO 2

DAL LABORATORIO ALLA STRADA: L'EMERGENZA
GLOBALE DEI CANNABINOIDI SINTETICI

Dal laboratorio alla strada: l'emergenza globale dei cannabinoidi sintetici

I cannabinoidi sintetici, o cannabimimetici, sono un'ampia classe di designer drugs caratterizzati da un'alta affinità di legame per i recettori dei cannabinoidi nel corpo umano, ma strutturalmente diversi dai fitocannabinoidi e dagli endocannabinoidi.

Queste molecole di sintesi giocano un ruolo fondamentale nell'evoluzione del mercato delle cosiddette “*Legal High*” o “*Herbal High*”, termini che da un lato sottolineano la possibilità che tali prodotti aggirino i controlli di legge, e dall'altro enfatizzano la loro non sempre reale origine naturale. Oggi la definizione correntemente accettata dalla comunità scientifica è il termine “*Nuove Sostanze Psicoattive*” (Novel Psychoactive Substances, da cui l'acronimo NPS), definite dalle Nazioni Unite come “tutte quelle sostanze d'abuso, sia in forma pura che in composti, non controllate dalle Convenzioni sulle Sostanze Stupefacenti e Psicotrope emanate dalle Nazioni Unite nel 1961 e nel 1971, ma che possono costituire una minaccia per la salute pubblica”. L'aggettivo “nuovo” è da riferirsi non alla sintesi della sostanza, che spesso non è recente, come evidenziato, per i cannabinoidi sintetici nel capitolo precedente, ma all'insorgenza di questo fenomeno d'abuso, divenuto emergente solo negli ultimi anni. Un termine meno adottato, ma probabilmente più coerente con la definizione di cannabinoidi sintetici, è “*Designer Drugs*”, coniato inizialmente negli anni Ottanta del secolo scorso per i composti ecstasy-like, e che pone l'accento sulla loro natura sintetica. Secondo la definizione, per Designer drugs si intende qualsiasi analogo strutturale e/o funzionale di una sostanza controllata, progettata per simularne o mimarne gli effetti farmacologici, eludendo i controlli e qualsiasi ripercussione legale.

A partire dagli inizi degli anni 2000, in Europa e successivamente in America, i cannabinoidi sintetici sono iniziati a comparire sul mercato

clandestino sottoforma di prodotti vegetali denominati Spice, caratterizzati da un'intensa fragranza, ma non derivanti dalla pianta della Cannabis. Inizialmente apparsi in siti internet ed in negozi specializzati (“*Head Shop*”, “*Smart Shop*”) attorno al 2004 se non prima, sono divenuti presto popolari nei Paesi dell'Europa Centrale. Nel 2007 iniziarono ad attirare l'attenzione di un pubblico più grande e raggiunsero un alto grado di popolarità nel 2008, e, solo a partire da questi anni il fenomeno giunse nel mirino del Centro Europeo di Monitoraggio per le Droghe e delle Tossicodipendenze (EMCCDA), quando fu riportato il primo caso di identificazione analitica, nel corso di un'indagine forense in Germania e Austria, del cannabinoide sintetico JWH-018, all'interno di un prodotto denominato “Spice”; e di un cannabinoide sintetico non classico CP 47,497-C₈ [42,43]. Da allora sono iniziati ad essere identificati altre molecole ad attività cannabimimetica strutturalmente correlate al JWH-018 [44-48].

I cannabinoidi sintetici rappresentano oggi il gruppo più ampio di sostanze attualmente monitorate dal Sistema di Allerta Precoce dell'Unione Europea. Sono stati registrati un totale di 169 cannabinoidi sintetici a partire dal 2008 a dicembre 2016: 1 caso riportato nel 2008, 9 nel 2009, 11 nel 2010, 23 nel 2011, 30 nel 2012, 29 nel 2013, 30 nel 2014, 25 nel 2015, 11 nel 2016 [49].

Molti cannabinoidi sintetici monitorati dall'EMCDDA attraverso il sistema europeo di allerta precoce possiedono nomi in codice relativi alla loro scoperta scientifica. In alcuni casi il nome rappresenta le iniziali del loro primo scopritore (ad esempio i composti “JWH” fanno riferimento a John W. Huffman; i composti “AM” fanno riferimento ad Alexandros Makriyannis). In altri casi i nomi in codice originano dal nome dell'istituzione o compagnia in cui è avvenuta la loro prima sintesi (ad esempio i composti “HU” fanno riferimento all'Università di Hebrew in

Gerusalemme; i composti “CP” fanno riferimento all’industria farmaceutica Charles Pfizer. In altri casi ancora i nomi sono stati scelti probabilmente dai produttori di “legal high” al fine di incentivare il mercato di questi prodotti. Esempi calzanti sono AKB-48 e 2NE1, nomi alternativi di APINACA e APICA. Il primo è il nome di una popolare band di ragazze giapponesi; il secondo è il nome di una band di ragazze sud coreane. Il cannabinoide sintetico XLR-11 sembra sia stato nominato così dopo che il primo carburante liquido per razzo è stato sviluppato negli USA per l'uso in aeromobili, forse alludendo all'intenzione del venditore per coloro che consumano la sostanza. I nomi in codice di molti cannabinoidi sintetici derivano dal loro lungo nome IUPAC: ad esempio APICA è il diminutivo del composto *N-(1-adamantyl)-1-pentyl-1H-indole-3-carboxamide*.

2.1) La produzione e la distribuzione

La maggior parte dei cannabinoidi sintetici usati a scopi voluttuari sono prodotti da industrie chimiche presenti in Cina. Queste molecole sintetiche, sono aggiunte durante il processo di produzione mediante dissoluzione in un solvente organico (acetone o etanolo) spruzzando poi la soluzione ottenuta direttamente sulle foglie da utilizzare come base vegetale per le miscele di fumo. Sono comunemente utilizzate come carrier di cannabinoidi sintetici le piante di Damiana (*Turnera diffusa*) e Lamiaceae come Melissa, *Mentha* e *Thymus*, etc.

Secondo quanto riportato dall’EMCDDA sono spediti come grandi carichi di polvere in Europa usando società di express mail e corriere; quantità maggiori possono essere spedite con il trasporto aereo o marittimo. Una volta in Europa, i prodotti vengono messi insieme. Attrezzature come miscelatori di cemento vengono utilizzati per mescolare insieme gli

ingredienti. Da lì, la miscela viene asciugata, confezionata e venduta, con possibile coinvolgimento della criminalità organizzata nel processo di distribuzione [49].

Si presentano essenzialmente come un trinciato di materiale erbaceo (circa 3 grammi) contenuto all'interno di bustine sulla quale è riportata chiaramente la dicitura “*not for human consumption*”, lasciando intendere che il prodotto è adibito all'aromaterapia. La loro ampia distribuzione è dovuta essenzialmente a strategie di marketing intelligenti, che si basano sull'utilizzo di imballaggi colorati con immagini suggestive progettati per attirare l'attenzione del consumatore (Figura 1).



Figura 1: Herbal blend.

Dal monitoraggio del web mondiale è chiaro che Internet costituisce una nuova vetrina per gli spacciatori, cosa che desta particolare preoccupazione sia dal punto di vista sociale che sanitario [50, 51]. Ad oggi, esistono un numero sempre crescente di siti web in cui gli utenti possono ordinare i prodotti senza restrizioni di età, a basso costo e, per molte sostanze, legalmente. I trafficanti di droga online spesso si nascondono dietro l'anonimia del Deep Web (o Dark Net), l'Internet sommerso composto da tutti quei siti non accessibili con i normali motori di ricerca. Criptomercati della droga come Silk Road (oggi chiuso), Evolution e Agora, allo stesso di un normalissimo mercato online forniscono a fornitori e acquirenti

un'infrastruttura per effettuare transazioni e servizi, come la valutazione del venditore e dell'acquirente e i forum di discussione. Per facilitare transazioni anonime si utilizzano criptovalute, come i Bitcoin, e si ricorre ad imballaggi discreti per agevolare il trasporto di piccole quantità di droga attraverso canali commerciali consolidati. Generalmente sono le spedizioni multi-kilogram, provenienti da altri continenti, a venire spesso intercettate dalle autorità europee.

Venduti con innumerevoli denominazioni (*Spice, Aroma, K2, Cloud 9, Mojo, etc.*) e pubblicizzati come prodotti di incenso, additivi da bagno, rinfrescanti, potpourri da meditazione, questi prodotti sono divenuti altamente popolari, specialmente per la loro non rilevabilità ai test di screening routinari [52-54]. Non è infatti facile determinare l'esatta composizione dei prodotti contenenti cannabinoidi sintetici, spesso a causa della mancanza di materiali di riferimento, ma anche a causa della presenza di agenti mascheranti di origine naturale come il tocoferolo (vitamina E), eugenolo, o acidi grassi, che sono comunemente ed intenzionalmente aggiunti con lo scopo di confondere l'identificazione delle molecole psicoattive.

Analogamente al cannabinoide naturale Δ^9 -THC, i cannabinoidi sintetici condividono le medesime vie di assunzione, e possono così essere fumati, insufflati o ingeriti. Recentemente, con la diffusione dell'utilizzo delle sigarette elettroniche, i cannabinoidi sintetici si trovano miscelati in soluzioni (e-liquid) da inalare mediante un vaporizzatore a penna (e-cigarette) [55]. Ciò rispecchia probabilmente la recente popolarità dell'utilizzo delle sigarette elettroniche anche nell'assunzione delle sostanze d'abuso ricreative, che da un lato sono ritenute un'alternativa salutare al fumo di sigaretta e dall'altra mascherano il caratteristico odore aromatico della Spice.

2.2) Farmacotossicologia

Gli effetti farmacologici associati all'utilizzo dei cannabinoidi sintetici dipendono fondamentalmente dalla loro alta affinità di legame con i recettori CB₁ e CB₂. In particolare, queste molecole esercitano i loro effetti sul sistema nervoso centrale mediante l'attivazione dei CB₁, localizzati nell'encefalo (nella corteccia cerebrale, nei gangli basali e nell'ippocampo) e nel sistema nervoso periferico ^[56]. Alcuni utilizzatori di Spice hanno riportato effetti simili o addirittura più amplificati di quelli ottenuti dalla cannabis, descritti come benessere ed euforia, disinibizione, cambiamenti delle percezioni visive, tattili, uditive, cambiamento della percezione dello spazio e del tempo, allucinazioni. Gli effetti acuti dei cannabinoidi sintetici tipicamente durano da 30-120 minuti, ma i sintomi possono persistere fino al giorno successivo (sensazione “*hangover*”, dall'inglese sbornia).

La potenza più elevata dell'azione di queste molecole potrebbe essere spiegata da esperimenti condotti in vitro che hanno suggerito che, mentre il Δ^9 -THC agisce come agonista parziale sul recettore CB₁, i cannabinoidi sintetici agiscono come agonista pieni e potenti ^[57]. Ad esempio, JWH-018, oltre che essere agonista pieno di CB₁, rispetto al Δ^9 -THC, possiede un'affinità recettoriale al CB₁ circa 4 volte maggiore e al CB₂ 10 volte maggiore ^[58]. Anche i metaboliti dei cannabinoidi sintetici di solito preservano una maggiore affinità recettoriale rispetto il Δ^9 -THC e potrebbero spiegare l'aumento della tossicità e/o mortalità associata all'esposizione a cannabinoidi sintetici. Va ricordata inoltre, la mancanza nelle miscele vegetali del cannabidiolo, fitocannabinoide presente nella marijuana caratterizzato da proprietà ansiolitiche e antipsicotiche ^[59].

Mentre le affinità recettoriali al CB₁ e CB₂ sono disponibili per molti di questi composti chimici sperimentali, dati farmacologici e tossicologici in vivo sono piuttosto scarsi e non sono mai stati testati negli animali prima

della loro identificazione in prodotti confiscati da utilizzatori umani. Inoltre, effetti tossicologici e reazioni avverse non possono essere interamente predetti, in quanto variano con la dose, la via di somministrazione, la vulnerabilità individuale e con la concomitante assunzione di altre droghe ^[60]. Alcuni autori correlano il consumo dei cannabinoidi sintetici con il manifestarsi di complicazioni psichiatriche e sintomi di overdose, in funzione della natura chimica e della dose assunta di cannabinoide sintetico. Sono riportati in letteratura un gran numero di intossicazioni non fatali, e un numero molto piccolo di casi mortali associata al loro uso ^[61-71]. Dal momento che queste molecole sono molto potenti sotto il profilo biologico, è evidente che il potenziale di manifestazione di effetti tossici avversi appare essere molto alto. Nel 2014 in Russia il cannabinoide sintetico MDMB-FUBINACA è stato correlato a più di 600 casi di intossicazione, inclusi 15 decessi, in un periodo di sole 2 settimane. Nel 2016 la sostanza è stata rinvenuta anche sul mercato europeo, ponendo in stato di allerta l'EMCDDA ^[49].

In letteratura sono presenti numerosi report che associano determinati stati clinici al consumo di cannabinoidi sintetici, molti dei quali sono stati confermati analiticamente mediante analisi tossicologiche condotte su matrici biologiche prelevate dal soggetto. In altri casi non sono stati condotti studi tossicologici.

Gli effetti clinici avversi sono distinti primariamente in effetti fisici e psicoattivi. Di seguito sono riportati degli esempi.

2.2.1) Effetti fisici

Effetto cardiovascolare: sono limitati principalmente all'aumento della tachicardia, riportata in numerosi case report, e ha coinvolto numerosi cannabinoidi sintetici. Altri effetti comuni sono l'aumento o la diminuzione

della pressione sanguigna. Sono state riportate in letteratura anche conseguenze cardiovascolari più gravi, quali ad esempio dolore al petto e infarto al miocardio [72-77].

Effetto gastrointestinale: sono riportati sintomi quali nausea associata con agitazione, tachicardia, sonnolenza, vomito e allucinazioni. Hopkins e Gilchrist descrivono un caso di ipermesi da cannabinoide (CHS), consistente in piccoli e ricorrenti episodi di dolore addominale e vomito, che ha interessato un consumatore cronico di cannabinoidi sintetici [78]. I sintomi iniziarono mentre il soggetto routinariamente utilizzava marijuana e sono continuati dopo che ha smesso con la marijuana ma ha iniziato con i sintetici. L'analisi del prodotto ha identificato JWH-018, JWH-073, JWH-122, AM-2201, AM-694, mentre l'analisi delle urine ne ha confermato i metaboliti. La risoluzione completa dei sintomi è stata segnalata dopo due settimane di astinenza.

Danneggiamento renale: nel corso degli ultimi anni il danneggiamento renale è stato aggiunto alla lista delle tossicità associate con l'uso di cannabinoidi sintetici [79-81]. Recentemente, sono stati riportati oltre 20 casi di insufficienza renale acuta associata con necrosi tubulare acuta dopo consumo di cannabinoidi sintetici.

Danni a livello epatico sono stati riportati relativamente al consumo di XLR-11. Effetti riportati includevano vomito, dolore al fianco, dolore addominale e lesioni acute del rene (diagnosticate con una aumentata concentrazione di creatinina urinaria). In entrambi i casi i dati clinici sono stati confermati dalla presenza del cannabinoide sintetico e del suo metabolita (acido N-pentanoico di UR-144).

Effetto polmonare: numerosi report sono collegati a disfunzioni polmonari associate all'utilizzo di cannabinoidi sintetici [82-83]. Infiltrazioni polmonari diffuse (accumulo di liquidi nel polmone) sono state riportate in un soggetto di 21 anni dopo inalazione cronica di un prodotto contenente cannabinoidi sintetici multipli in un periodo di 4 mesi. AM-2201 è stata quantificata nel sangue del soggetto, mentre JWH-122 e JWH-210 sono stati identificati nel sangue ma non quantificati.

Effetti neurologici: sono stati riportati effetti quali tremori, atassia, fascicolazioni, ipertonica, iperflessione ed iperestensione. Alcuni autori hanno riportato diversi casi di individui che mostravano disabilità motoria fine con conseguente difficoltà alla guida di un veicolo a motore [84-85]. Sono stati riportati anche effetti come vertigini, intorpidimento, ed effetti neurologici più seri come convulsioni, perdita di coscienza, coma [86-87]. Le convulsioni sono state riportate in casi di individui che avevano ingerito JWH-018, AM2201, JWH-122, JWH-210. Non è chiaro se tale manifestazione sia da attribuire al cannabinoide sintetico stesso o ad altre sostanze presenti nell'herbal blend, inoltre non sono conosciuti gli effetti di una multiassunzione di cannabinoidi sintetici. Tuttavia, è stato ipotizzato che la mancanza di fitocannabinoidi quali cannabidiolo e cannabinolo, caratterizzati da effetti anticonvulsanti, potrebbero determinare un aumento del rischio convulsivo nei soggetti utilizzatori.

2.2.2) *Effetti psicoattivi*

Gli effetti che si manifestano a carico del sistema nervoso centrale includono alterazioni emozionali del soggetto o, in caso di individui vulnerabili, persino vere e proprie psicosi [88-92]. Sono stati descritti effetti cognitivi, quali la disabilità nell'attenzione, concentrazione e memoria.

Sebbene i consumatori di cannabinoidi sintetici riportano di aver sperimentato stati di euforia, emozioni negative come ansia, panico sono state dichiarate. Alcuni utilizzatori dichiarano disturbi nel linguaggio, che appare rallentato e disorganizzato. Tra gli effetti comportamentali, numerosi report descrivono soggetti che, durante lo stato di intossicazione, manifestavano agitazione o persino stati violenti e aggressivi. Più rari sono invece i comportamenti suicidari, o automutilatori.

2.2.3) Uso cronico

Non ci sono dati certi sui rischi che un consumatore cronico di cannabinoidi sintetici può manifestare a lungo termine. Non sono da escludere, come possibili conseguenze di un prolungato uso di cannabinoidi sintetici, significative alterazioni nel processo emozionale e nelle funzioni cognitive. Comunque, è possibile che gli effetti a lungo termine potrebbero essere gli stessi di quelli associati ad un consumo prolungato di marijuana, quali la riduzione del volume dell'encefalo, influenzando amigdala ed ippocampo, centri associati alla memoria e alla patofisiologia di schizofrenia.

2.3) Status legale in Italia

La diffusione delle droghe sintetiche in Italia, ed in particolare dei cannabinoidi sintetici, rappresenta un fenomeno piuttosto recente ma già molto diffuso, specialmente nelle regioni del nord Italia, dove più frequenti sono i casi di intossicazione correlati al consumo di cannabinoidi sintetici che richiedono ricovero al Pronto Soccorso ^[93]. Questo fenomeno, che sta destando notevoli preoccupazioni sia in ambito sanitario che tra le Forze dell'Ordine, rende necessarie delle azioni di contrasto coordinate con il

Ministero della Salute atte ad impedirne la diffusione e a renderle illegali attraverso il loro inserimento in Tabella I del D.P.R. 309/90 e s.m.i.

Visto l'elevato numero di cannabinoidi sintetici circolanti nel mercato illecito e l'elevata diversificazione strutturale che li caratterizza, molte giurisdizioni, compresa l'Italia, hanno creato un sistema per controllare queste molecole sulla base della loro struttura generale (o Markush) invece che sulla loro identità specifica (nome da strada). In questo modo i nuovi analoghi sono già controllati prima ancora che vengano creati. In Tabella 1, sono specificati i cannabinoidi sintetici sottoposti a controllo legislativo in Italia.

<i>Tabella I delle Sostanze Stupefacenti e Psicotrope del D.P.R. 309/90 e s.m.i.</i>
CP 47,497
CP47,497-omologo C8
AM-694
JWH-018
JWH-073
JWH-122
JWH-250
UR-144
AB-CHMINACA
AB-FUBINACA
ADB-CHMINACA
ADB-FUBINACA
APP-FUBINACA
CUMIL-5F-PINACA
MDMB-CHMICA
5F-APP-PICA
5F-APP-PINACA
5F-PB22
BB-22
Analoghi di struttura derivanti dal 3-benzoilindolo
Analoghi di struttura derivanti dal 3-fenilacetilindolo
Analoghi di struttura derivanti dal 3-(1-naftoil)indolo
Analoghi di struttura derivanti da indazol-3-carbossamide
Analoghi di struttura derivanti da indol-3-carbossamide

Tabella 1: Cannabinoidi sintetici sottoposti a controllo legislativo in Italia, specificati nella Tabella I delle Sostanze Stupefacenti e Psicotrope del D.P.R. 309/90 e s.m.i.

Recentemente, l'EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction) lancia un'allerta di grado 3 trasmettendo un comunicato relativo a due casi di decesso correlati all'assunzione di una molecola denominata 1 - methoxy - 3, 3 - dimethyl - 1 - oxobutan - 2 - yl - 1 - (cyclohexylmethyl) - 1H - indazole - 3 carboxylate (MO - CHMINACA), avvenuti in Svezia nel 2016. I casi di decesso sono stati confermati analiticamente (ESI (+) - MS/MS e LC-QTOF) dal Swedish National Board of Forensic Medicine su campioni biologici post-mortem prelevati da due maschi trovati morti nelle proprie abitazioni. In uno dei due casi MO-CHMINACA è stato correlato alla causa della morte, in combinazione con altre due molecole identificate (acriloilfentanil e 4-MeO- α -POP). Nel secondo caso, la molecola MO-CHMINACA non viene riportata tra le cause di morte. Il Network EU EWS (European Early Warning System) riporta, inoltre, due segnalazioni relative a rinvenimenti della molecola in questione. Nel primo caso, la Svezia ne ha segnalato, nel mese di gennaio 2017, l'identificazione analitica (GC-MS, GC-IRD, NMR) da parte del Centro Nazionale Forense Svedese in un campione di materiale erbaceo di peso netto pari a 5 grammi sequestrato dalla Polizia Svedese nel gennaio 2016. Nel secondo caso, la notifica dell'identificazione di MO-CHMINACA giunge dalla Germania in un campione di materiale erbaceo contenuto in due pacchetti etichettati come "Sexy Monkey", sequestrati dalla Polizia di Baden-Württemberg nel 2016.

MO-CHMINACA è un cannabinoide sintetico di nuova generazione strutturalmente correlato alla molecola MDMB-CHMICA, recentemente segnalata dall'EMCDDA. La differenza strutturale tra le due molecole risiede nella struttura del core e nel gruppo linker: l'indolo e il gruppo metanamide dell'MDMB-CHMICA vengono sostituiti da un indazolo e da un gruppo metanoato nell'MO-CHMINACA (Figura 2).

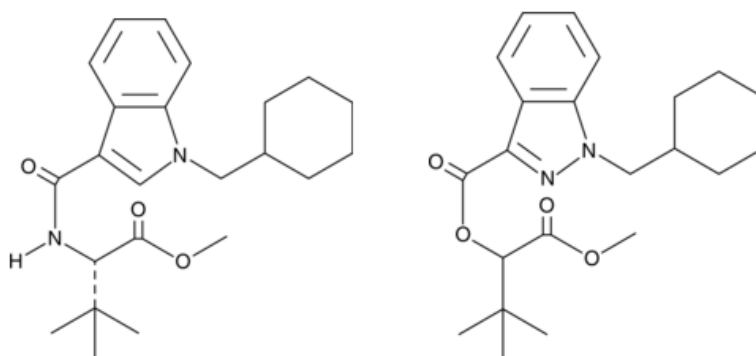


Figura 2: A sinistra, cannabinoide sintetico MDMB-CHMICA. A destra, cannabinoide sintetico MO-CHMINACA.

Attualmente il cannabinoide sintetico in questione non è incluso in Tabella I nel nostro Paese. Inoltre, in Italia, nessuna molecola strutturalmente correlata a MO-CHMINACA risulta controllata dal punto di vista legale, in quanto in Tabella I non sono specificati gli analoghi di esteri dell'indolo 3-carbossilato.

Ciò conferma da un lato che la diffusione di molecole sintetiche di nuova generazione è un fenomeno più che attuale, e la dinamicità con la quale si manifesta rende fondamentale la collaborazione tra tutte le figure coinvolte, a partire dai legislatori alle Forze dell'Ordine, dagli operatori del settore sanitario agli analisti di laboratorio.

CAPITOLO 3

**IL FLUIDO ORALE: MATRICE ALTERNATIVA NELLA
RILEVAZIONE DEI CANNABINOIDI SINTETICI**

Il fluido orale nella rilevazione dei cannabinoidi sintetici

L'accertamento dello stato di intossicazione di un soggetto ad opera di sostanze stupefacenti è divenuto piuttosto routinario a causa della sua implicazione in problemi ad elevato impatto sociale. In particolare, di grande rilevanza è la problematica sociale legata alla sicurezza sulla strada: diversi studi hanno evidenziato come gran parte degli incidenti automobilistici fatali siano correlati all'abuso di alcol e droghe [94-96]. Generalmente, l'analisi tossicologica è condotta principalmente su sangue, plasma ed urine, sebbene, specialmente negli ultimi dieci anni, l'uso di matrici alternative sta suscitando un notevole interesse in tossicologia clinica e forense. In particolare, l'analisi su saliva, o meglio su fluido orale, sta attualmente ricevendo molto interesse per il monitoraggio delle sostanze d'abuso, sia per la facilità e la non invasività del prelievo, a rispetto del paziente, sia perché, differentemente dalle urine, esibisce una possibilità minima di adulterazione [97-101]. In aggiunta, la possibilità di identificare l'analita nella sua forma non metabolizzata, rende il fluido orale la matrice di scelta come prova concreta del consumo recente della sostanza, anche se la possibilità di un lungo tempo di eliminazione dovuto alla cronicità d'uso deve essere considerata.

La prima sperimentazione mirata alla misurazione di analiti biologici nel fluido orale risale alla metà del XIX secolo, con il primo report della misurazione di etanolo nel 1875 [102]. Ulteriori esperimenti nel 1930 dimostrarono il ruolo della lipofilicità e della ionizzabilità dei soluti nel loro partizionamento tra sangue e fluido orale. Perciò, un'ampia varietà di analiti, inclusi steroidi, ormoni, enzimi, anticorpi, farmaci, sono stati determinati nel fluido orale, principalmente in ambito clinico. Dal 1970 è stata investigata la possibilità di usare il fluido orale come matrice biologica nella rilevazione delle droghe in casi forensi. In anni recenti,

l'interesse nell'utilizzo del fluido orale è aumentato, specialmente nei casi di guida sotto l'influenza delle droghe (*DUID - Driving Under Influence of Drugs*) [103-106]. Come riportato dai numerosi dati in letteratura, la migliore comprensione della relazione tra fluido orale/sangue e il perfezionamento dei metodi di campionamento e analisi, ha contribuito all'utilizzo di tale matrice per l'identificazione e la quantificazione di un ampio spettro di molecole di interesse tossicologico-forense [107-112].

Senza dubbio, l'introduzione di sistemi LC-MS come tecnica laboratoristica altamente sofisticata, che accorpa tutte le potenzialità di un sistema cromatografico ad alte prestazioni con l'elevata specificità e sensibilità tipica dello spettrometro di massa, ha contribuito notevolmente allo sviluppo di sistemi di drug testing su volumi di matrici biologiche molto limitati, quali il fluido orale.

3.1) La composizione

Sebbene la dicitura "saliva" sia la più comunemente utilizzata per descrivere il liquido contenuto nella cavità orale, non è la definizione più corretta. Il fluido orale, termine attualmente accettato, è il prodotto delle cellule sierose e mucose delle ghiandole salivari: la parotide (25%), la submandibolare (75%) e la sub-linguale (4%), nonché numerose altre ghiandole minori localizzate in tutta la cavità orale (Figura 1) [113-116].

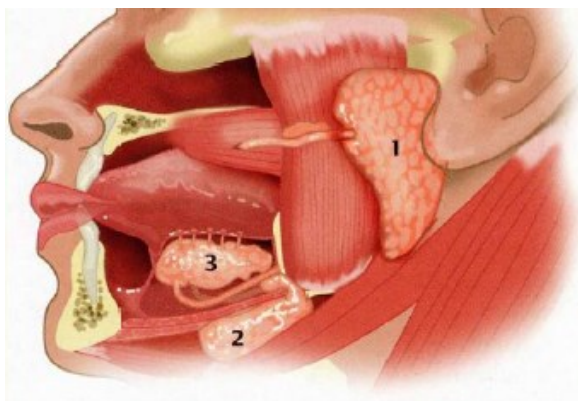


Figura 1: rappresentazione schematica della bocca in cui è evidenziata la localizzazione delle principali ghiandole salivari. 1) Ghiandola parotide; 2) Ghiandola sub mandibolare; 3) Ghiandola sublinguale.

In particolare, le cellule sierose secernono un fluido acquoso incolore con un alto contenuto elettrolitico e le cellule mucose secernono un fluido più viscoso contenente proteine, glicoproteine e polisaccaridi. Stimoli meccanici producono saliva sierosa, mentre stimoli alimentari producono saliva contenente muco.

La parotide è, delle tre, la ghiandola più grande, posizionata di fronte e sotto ciascun orecchio. Sotto il controllo del sistema nervoso centrale, questa ghiandola produce saliva ad un flusso di 0,3 ml/min, equivalente a circa il 65% della saliva totale secreta da tutte le ghiandole. La submandibolare è posizionata sul lato interno della mandibola inferiore e produce saliva ad un flusso di circa 0,26 ml/min. Posizionata al di sotto della lingua, la sublinguale produce la più bassa quantità di saliva ad un flusso di 0,012 ml/min. In aggiunta alle tre ghiandole maggiori, si è confermata la presenza di numerose altre ghiandole minori accessorie situate sulla lingua e il palato. La secrezione cellulare è di tipo esocrina.

Il fluido orale svolge diverse funzioni biologiche. In particolare gioca un ruolo biologico fondamentale nel mantenimento dell'integrità dentale, proteggendo la bocca contro i microrganismi e le tossine, lubrificando i tessuti orali, e prendendo parte delle prime fasi della digestione.

Il fluido orale è un fluido viscoso composto principalmente da saliva, fluido gengivale, secrezioni nasale e bronchiale, la cui complessità composizionale è incrementata dalla presenza di batteri, cellule epiteliali, eritrociti, leucociti, detriti di cibo, prodotti utilizzati per l'igiene della cavità orale. Il 98% è rappresentato da acqua, al cui interno sono solubilizzati elettroliti, immunoglobuline, enzimi, proteine, DNA. Diversi ormoni ed enzimi plasmatici sono presenti anche nel fluido orale, sebbene a basse concentrazioni. La concentrazione elettrolitica varia in base a fattori quali età e stato di salute.

I principali elettroliti inorganici sono rappresentati da sodio, potassio, cloro, calcio, fosfato e bicarbonato. In particolare, calcio e fosfato sono responsabili del mantenimento dell'integrità dentale mediante la remineralizzazione della superficie del dente a seguito dell'esposizione ad acidi durante il consumo di cibi e bevande. Il bicarbonato e fosfato giocano un ruolo fondamentale nella capacità tampone della saliva.

La frazione proteica è molto bassa (0,3%) ed è rappresentata principalmente da amilasi (0,7%) e da glicoproteine, le mucine (0,26%) (Tabella 1).

Function	Salivary component
Anti-bacterial	Amylases, cystatins, histatins, mucins, peroxidases
Anti-viral	Cystatins, mucins
Anti-fungal	Histatins
Tissue coating	Amylases, cystatins, mucins, proline-rich proteins, stratherins
Lubrication and viscoelasticity	Mucins, stratherins
Mineralisation	Cystatins, histatins, proline-rich proteins, stratherins
Digestion	Amylases, Mucins
Buffering	Carbonic anhydrase, histatins

Tabella 1: Principali funzioni della componente proteica presente nel fluido orale

La funzione primaria delle proteine e glicoproteine nella saliva è quella di facilitare la ritenzione dell'umidità nella gengiva, agire da barriera protettiva e lubrificante ed esercitare attività antimicrobica. Le proteine, localizzate principalmente sulla superficie della gengiva, rientrano in quattro categorie: proteine ricche in prolina, staterine, istatine e cistatine [117]. Le prime coprono circa il 70% delle proteine secretorie e giocano un

ruolo importante nel mantenimento dell'igiene e della salute della cavità orale; le seconde e le terze hanno una natura enzimatica e svolgono un importante ruolo di inibizione della crescita e precipitazione di cristalli di sali di fosfato di calcio; le quarte inibiscono le proteasi enzimatiche. Una proteina di vitale importanza è l'amilase, coinvolta nella digestione del cibo e caratterizzata da attività antimicrobica.

Una componente lipidica, escreta da diversi tipi ghiandolari, è stata identificata nella saliva. Lipidi neutri, come colesterolo, esteri del colesterolo, trigliceridi, di gliceridi e monogliceridi, rappresentano circa il 70-95% dei lipidi presenti nella saliva. I lipidi polari, come la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e sulfatidi, sono stimati per circa l'1-5% della concentrazione lipidica totale. I lipidi risultanti da contaminazione alimentare determinano una concentrazione lipidica salivare altamente variabile, in grado di alterare l'assorbimento e la biodisponibilità delle molecole ^[118].

Il flusso salivare è regolato dal rilascio di neurotrasmettitori e ormoni, con una variabilità di flusso a seconda di fattori, come ad esempio durante lo stato di riposo o lo stato stimolante (appetito, stato emozionale). La secrezione tipica giornaliera è di 500-1550 ml, ad un flusso medio di 0,6 ml/min (range 0,1-0,8 ml/min; durante il sonno 0,05 ml/min). Tuttavia, il flusso salivare varia a seconda di fattori quali il fumo, l'uso di droghe, lo stato di idratazione, o addirittura dalla temperatura e dal clima, esercizio fisico. La sindrome della secchezza delle fauci è una condizione relativamente comune e può essere causata ad esempio dalla mancanza di un'appropriata idratazione dell'individuo o da stati d'ansia, e questo potrebbe richiedere più tempo nella procedura di raccolta del campione. Il ritmo circadiano, l'attività fisica e lo stato di salute di un individuo, tra cui malattie del cavo orale, influenza la composizione e la velocità di flusso del fluido orale ^[116,119]. Il fluido orale ha un pH tipicamente debolmente

acido, ma, con l'aumento del flusso salivare, può variare da 5.5 a 7.9 [116,120]. Di conseguenza, quando la produzione di fluido orale è stimolata, i cambiamenti di pH possono influenzare la velocità di partizione delle droghe tra il plasma e il fluido orale [121-122]. Allo stesso modo, il pH salivare può variare a seguito dell'assunzione di cibo, quali ad esempio bevande zuccherate, caffè, cioccolato, tabacco, chewing gums, etc.

3.2) *La farmacocinetica delle sostanze d'abuso*

Nell'ultima decade ci sono stati significativi sviluppi nella comprensione della farmacocinetica delle sostanze d'abuso nel fluido orale, ed in particolar modo nella comprensione del significato clinico e forense della concentrazione rilevata, e come tale concentrazione sia o meno correlata a quella ematica, fornendo così una migliore correlazione con gli effetti farmacodinamici, come l'alterazione delle performance del soggetto [123-129].

Analiti endogeni ed esogeni circolanti nel flusso ematico sono trasferiti dal sangue al fluido orale mediante attraversamento delle pareti dei capillari, della membrana basale e, step limitante la velocità, passaggio attraverso le membrane lipofile delle cellule epiteliali ghiandolari. I meccanismi che regolano l'incorporazione delle droghe nel fluido orale sono la diffusione passiva, l'ultrafiltrazione, la secrezione dal sangue e il trasporto attivo. La diffusione passiva rappresenta la più importante via di ingresso per molte sostanze psicoattive, con la possibile eccezione dell'etanolo, che, a causa del suo basso peso molecolare, viene ultrafiltrato. Questo processo è limitato alle molecole non legate alle proteine plasmatiche e alle molecole non ionizzate con un peso molecolare inferiore ai 500 Da. I fattori che influenzano l'ingresso all'interno del fluido orale mediante diffusione sono il peso molecolare, il grado di ionizzazione (pKa), la lipofilità, la

configurazione spaziale, il grado di legame con le proteine, il pH del fluido orale e del plasma. Questi fattori guidano il partizionamento delle droghe ionizzabili tra fluido orale e sangue (OF/B), il cui valore differirà tra molecola a molecola come risultato delle diverse proprietà chimiche che le caratterizzano. Il valore del rapporto OF/B di una data molecola può essere calcolato utilizzando l'equazione di Henderson-Hasselbalch, conoscendo la pKa della molecola, il pH del plasma e della saliva e il grado di legame della molecola in esame alle proteine.

Il calcolo del rapporto OF/B per le molecole di natura basica e acida è rappresentato dalle equazioni a e b:

$$\frac{OF}{B} = \frac{[1+10^{(pK_d - pH_{OF})}]}{[1+10^{(pK_d - pH_B)}]} + \frac{f_B}{f_{OF}} \quad \text{a)}$$

$$\frac{OF}{B} = \frac{[1+10^{(pH_{OF} - pK_d)}]}{[1+10^{(pH_B - pK_d)}]} + \frac{f_B}{f_{OF}} \quad \text{b)}$$

dove OF e B sono rispettivamente le concentrazioni della droga nel fluido orale e nel plasma; pK_d è il logaritmo della costante di ionizzazione della molecola; pH_{OF} e pH_B sono rispettivamente il pH del fluido orale e del sangue; f_B e f_{OF} sono rispettivamente la frazione della molecola legata alle proteine plasmatiche e salivari.

L'equazione di Henderson-Hasselbalch mostra chiaramente che il rapporto OF/B dipende dal pH della saliva, che come detto precedentemente è compreso tra 6.2-7.4, a seconda della natura delle contaminazioni esterne. Di conseguenza, droghe acide (es. THC-COOH) con $pK_a < 5.5$ generalmente hanno un rapporto OF/B < 1 ; droghe neutre con una $pK_a > 5.5$ e < 8.5 hanno un rapporto OF/B di circa 1; droghe basiche hanno un

rapporto OF/B > 1 perché, essendo ionizzate, sono trovate ad alte concentrazioni nel fluido orale rispetto al sangue.

Basi deboli sono rilevate in alte concentrazioni e per tempi prolungati nel fluido orale rispetto al plasma a causa di un fenomeno di intrappolamento ionico, che si realizza a causa delle differenze di pH tra il sangue (7.4) e il fluido orale (4-6). La forma non ionizzata delle droghe è in equilibrio tra le membrane che separano il sangue dal fluido orale. Al pH più basso del fluido orale, le basi deboli ionizzano, aumentando la concentrazione totale della droga nel fluido orale.

Da notare che i rapporti OF/B aumentano temporaneamente di più di 100 volte nella fase iniziale se la droga è fumata o sniffata (cocaina, eroina, etc.) o assunta come preparazione orale. Per la maggior parte delle droghe, la correlazione OF/B non è così stretta, e non sempre è possibile stimare la concentrazione ematica di una sostanza dalla concentrazione della stessa nel fluido orale, a causa della grande variazione interindividuale. Per questa ragione, l'analisi del fluido orale non può del tutto rimpiazzare l'analisi delle matrici convenzionali nel drug testing, in quanto ciascuna matrice presenta le sue proprie caratteristiche con tutti i vantaggi e gli svantaggi che ne derivano, ma tutte indispensabili per la caratterizzazione del profilo farmacocinetico di una sostanza esogena.

3.3) I cannabinoidi sintetici nel fluido orale

La prima determinazione di cannabinoidi sintetici nel fluido orale è stata pubblicata nel 2011 da Coulter et al., che prelevarono del fluido orale dopo fumo di due herbal blend “Blueberry Posh” e “Black Mamba”, allora legali negli Stati Uniti ^[112]. Il metodo includeva la rilevazione delle molecole JWH-018, JWH-073, JWH-250, HU-210, CP-47,497 e CP-47,497 C₈. Dopo una singola sessione della miscela vegetale “Blueberry Posh”, la

massima concentrazione della molecola JWH-018 è stata trovata dopo 20 minuti, corrispondente al primo campionamento (35 ng/ml). Il cannabinoide era rilevabile fino a 12 ore dopo la prima assunzione. Dopo una singola sessione della miscela vegetale “Black Mamba” la massima concentrazione della stessa molecola è stata trovata dopo 20 minuti, alle concentrazioni di 5 ng/ml. In quest’ultimo caso, nel soggetto, JWH-018 non era più rilevabile dopo 5 ore dal fumo. In letteratura sono pubblicati numerosi lavori scientifici mirati allo sviluppo e alla validazione di nuovi metodi analitico-strumentali atti all’identificazione e quantificazione delle sostanze d’abuso di nuova generazione, tra cui i cannabinoidi sintetici, nel fluido orale, di cui i metodi LC-ESI-MS/MS ne rappresentano la maggioranza ^[130-135].

CAPITOLO 4
STABILITÀ DELLE SOSTANZE D'ABUSO

Stabilità delle sostanze d'abuso

La stabilità delle matrici biologiche è una delle più critiche proprietà da valutare durante lo sviluppo e la validazione di un nuovo metodo analitico-strumentale per l'analisi di molecole di interesse clinico e forense e dei loro metaboliti. La stabilità può essere definita come “misura della suscettibilità di un analita a fenomeni degradativi-idrolitici in una data matrice biologica, in determinate condizioni e per un dato intervallo di tempo”. Di solito, tra il campionamento e il test tossicologico è compreso un periodo di diversi giorni e spesso è richiesta la conservazione del campione per tempi lunghi oltre che diversi cicli di congelamento/scongelo se ulteriori analisi sono richieste. Per cui, la valutazione di questo parametro è fondamentale al fine di evitare tutte quelle condizioni che determinano una degradazione dell'analita d'interesse e, di conseguenza, per ottenere un dato analitico più accurato tipico di un metodo analitico robusto.

Lo studio di stabilità delle molecole nelle matrici biologiche è piuttosto complesso perché spesso l'instabilità è collegata alla natura della matrice stessa, ed è influenzata da fattori quali il pH del campione e la presenza di altre sostanze, oltre che da fattori esterni. In generale, l'instabilità in ogni campione tossicologico è dovuta a degradazione metabolica, trasformazioni chimiche, o ad una combinazione di entrambi ^[136]. Dopo la raccolta di un campione biologico gli enzimi possono rimanere attivi e continuare a degradare o trasformare le molecole *in vitro*. Questo processo può instaurarsi non solo in caso di matrici post-mortem, dove la degradazione degli analiti può essere accelerata da fenomeni di decomposizione putrefattiva, invasione microbica, etc., ma anche in campioni biologici ante-mortem, dopo la raccolta della matrice o durante il trasporto al laboratorio o durante la conservazione del campione biologico prima dell'analisi.

4.1) L'instabilità delle droghe: fattori chimici, fisici e biologici

La stabilità delle molecole può essere influenzata da numerosi fattori incluse le proprietà fisico/chimiche della droga, le caratteristiche della matrice, la procedura di campionamento del campione (quali la contaminazione da microrganismi), la selezione del contenitore di raccolta, l'uso di preservanti o altri additivi ^[137]. A causa di queste variabili la concentrazione di una determinata molecola durante l'analisi laboratoristica potrebbe non essere identica alla concentrazione della stessa al tempo del campionamento.

L'instabilità delle droghe è legata alla presenza di gruppi funzionali nella molecola suscettibili a trasformazione. Le più comuni fonti di instabilità della matrice che possono determinare perdita dell'analita per degradazione possono essere di natura fisica (luce, temperatura), chimica (pH, esposizione all'aria) e biologica (attività enzimatica).

Le principali reazioni molecolari che possono influire sulla stabilità delle molecole di interesse forense sono l'ossidazione e l'idrolisi. L'ossidazione, che comporta la rimozione di un elettrone dalla molecola (o l'aggiunta di ossigeno), può essere iniziata, ad esempio, dall'ossigeno dell'aria, dalla presenza di certi metalli in tracce, etc. Ad esempio, l'esposizione del THC all'aria provoca l'ossidazione a cannabinolo, assente nella cannabis, e dunque utilizzato come indice di freschezza del campione ^[138]. Sebbene le reazioni di ossidazione siano comuni nella decomposizione di una sostanza, le reazioni di idrolisi sono quelle maggiormente incontrate. Questo meccanismo, che può avvenire ad opera di processi chimici o enzimatici, comporta la "rottura" della molecola mediante scissione di un legame chimico. Di tutte le sostanze psicotrope conosciute, certamente la cocaina è la più nota in termini di instabilità in cui sia trasformazioni chimiche che enzimatiche portano alla produzione di prodotti idrolitici ^[139-140]. La

spontanea conversione della cocaina a benzoilecgonina, con idrolisi in corrispondenza del legame estereo, avviene in condizioni fisiologiche e a pH alcalino. In condizioni biologiche, le metilesterasi epatiche sono responsabili della conversione cocaina-benzoilecgonina, mentre le pseudocolinesterasi plasmatiche catalizzano la conversione cocaina-ecgonina metilestere. L'aggiunta di un inibitore della colinesterasi (fluoruro di sodio) dopo la raccolta del campione ematico inibiscono la produzione di ecgonina metilestere, ma non previene l'idrolisi chimica della cocaina a benzoilecgonina, dunque la cinetica può essere inibita applicando la corretta catena di custodia, cioè conservando il campione a basse temperature, o mediante aggiustamento del pH. L'idrolisi chimica deve essere necessariamente considerata anche durante il processo analitico, come ad esempio durante l'alcalinizzazione della matrice nello step estrattivo: in queste condizioni la benzoilecgonina eventualmente formata potrebbe risultare come artefatto analitico.

Un particolare tipo di scissione molecolare è quella che accade ad opera della temperatura, fattore che gioca un ruolo cruciale nella stabilità delle molecole di interesse forense, in quanto alcune droghe presentano un certo grado di instabilità termica. Ciò è particolarmente importante per quelle molecole che sono sottoposte ad elevate temperature, ad esempio, durante la somministrazione stessa. Per le molecole termolabili, i prodotti di termolisi generatosi, potrebbero essere indice di assunzione della sostanza attraverso il fumo di sigaretta. Il termine che descrive questo processo è "*termolisi*", e nell'ambito della tossicologia forense sono noti diversi esempi, tra cui l'identificazione dell'anidroecgonidina metilestere prodotta in seguito all'uso della cocaina crack, dell'1-fenil-cicloesene seguito dall'assunzione di fenciclidina e del transfenil propene seguito dall'uso di metamfetamina ^[141-143]. Anche i cannabinoidi naturali subiscono termolisi in seguito all'assunzione, in quanto durante il fumo di marijuana, mediante

sigaretta o pipa, fino al 30% di Δ^9 -THC subisce degradazione termica ^[144]. In letteratura, specialmente negli ultimi anni, è aumentato l'interesse dei ricercatori nello studio dei cannabinoidi sintetici, in termini di stabilità alla termolisi ^[145]. È noto che il cannabinoide sintetico UR-144, in seguito al processo di assunzione per via inalatoria, subisce degradazione termica con formazione di un degradante ad anello aperto caratterizzato da un'attività agonista recettoriale al CB₁ di approssimativamente quattro volte rispetto al suo progenitore (Figura 1) ^[146-147].

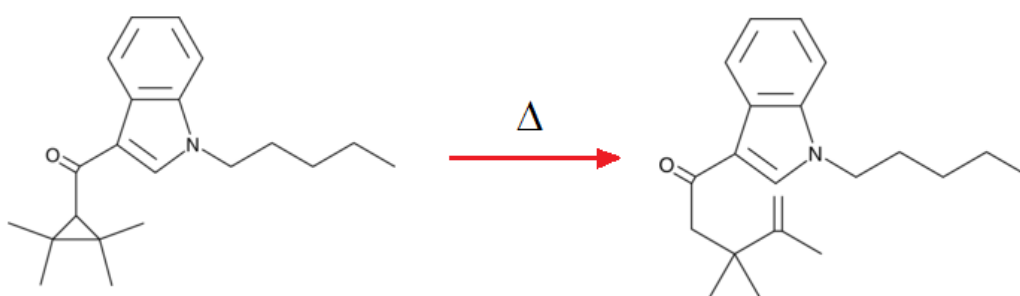


Figura 1: Struttura molecolare del cannabinoide sintetico UR-144 e del suo degradante ad anello aperto, che si forma durante il processo di smoking.

4.2) Catena di custodia

Tutto l'insieme delle procedure messe in atto per garantire l'autenticità, l'integrità, nonché la tracciabilità di un campione biologico dal momento del prelievo sino allo smaltimento prende il nome di “*Catena di Custodia*”. Differentemente da quanto accade in contesto clinico, dove l'intervallo di tempo che separa il prelievo del campione dal test tossicologico è molto breve, in un contesto forense non è raro che si presenti la situazione opposta e, indipendentemente dal controllo del laboratorio, la durata di questa fase pre-analitica può essere altamente variabile (ore in caso di compromissione alla guida, fino a diversi giorni nel caso di violenza sessuale). Con lo scopo di preservare e mantenere l'integrità del campione biologico debbono, pertanto, essere prese le misure necessarie dopo la

raccolta del campione, necessarie affinché venga garantita la validità di tutti gli step analitici da cui dipende l'accuratezza della determinazione quali-quantitativa dell'analita d'interesse.

La temperatura di conservazione del campione è un parametro fondamentale durante la catena di custodia di un campione. Per la conservazione a lungo termine, per la maggior parte dei campioni, sono normalmente richieste temperature di - 20°C, fatta eccezioni per matrici cheratiniche (capelli, unghie) che possono essere conservate a temperatura ambiente. Sebbene i campioni biologici di interesse clinico non siano preservati, l'uso di un preservante chimico è spesso richiesto nei campioni di interesse forense. Ad esempio, la preservazione del sangue con fluoruro di sodio (2% w/v) costituisce la routine in molti laboratori. L'inibizione dei microrganismi e degli enzimi con questo sale è importante per gli analiti comunemente incontrati, quali la cocaina e l'etanolo, in quanto è così inibita da un lato l'attività enzimatica e dall'altro la glicolisi.

Un'altra importante considerazione riguarda i principi attivi fotolabili (come gli alcaloidi dell'ergot, l'LSD, le fenotiazine, etc.), che richiedono necessariamente la conservazione del campione in contenitori protetti dalla luce diretta.

Il rapido afflusso delle sostanze psicoattive di nuova generazione, che negli ultimi anni sta interessando l'Europa, rende molto più ampio e diversificato il numero delle molecole d'interesse attualmente ricercate per scopi clinici/forensi. Per questa ragione, lo studio di stabilità strutturale di questi analiti nelle matrici biologiche convenzionali e alternative, è più che mai attuale.

CAPITOLO 5

**LA SPETTROMETRIA DI MASSA AD ALTA
RISOLUZIONE NELLE INDAGINI MOLECOLARI**

La spettrometria di massa ad alta risoluzione nelle indagini molecolari

Il successo dello studio della chimica degli ioni in fase gassosa e le sue applicazioni è stata guidata da continui sviluppi delle tecniche di spettrometria di massa, a partire dagli studi condotti da Thomson, le cui fondamentali osservazioni hanno permesso di creare le basi per lo sviluppo della spettrometria di massa come la conosciamo oggi, ossia uno dei metodi analitici più sensibili per la caratterizzazione strutturale delle molecole ^[148].

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che permette di ottenere informazioni qualitative e quantitative su entità molecolari dopo la loro conversione in ioni in fase gassosa. Nel corso degli anni la tecnica ESI-MS ha acquisito, in combinazione con la cromatografia ad alte prestazioni (HPLC), particolare importanza come strumento diagnostico nei laboratori clinici ^[149]. La sua popolarità si deve alla sua capacità di rilevare, in matrici complesse e con estrema sensibilità (quantità di femtomoli), biomolecole non volatili e termicamente labili, piccole o grandi che siano, di varia polarità, la cui analisi non potrebbe essere condotta normalmente con altre tecniche convenzionali.

5.1) La sorgente ionica

La spettrometria di massa studia gli ioni in fase gassosa, per cui il primo processo a cui una molecola va incontro all'interno di uno spettrometro di massa è la trasformazione delle molecole in ioni (ionizzazione) prima che essi vengano separati dall'analizzatore sulla base del loro rapporto m/z e successivamente rilevati. Il sistema di ionizzazione svolge un ruolo fondamentale in spettrometria di massa, in quanto da esso dipende anche il

numero, la natura e l'abbondanza dei frammenti molecolari che compaiono nello spettro di massa.

Una grande varietà di sorgenti ioniche, e dunque di tecniche di ionizzazione, sono state sviluppate nel corso degli anni. Le più importanti considerazioni sono l'energia interna trasferita durante il processo di ionizzazione e le proprietà chimico-fisiche dell'analita.

La scelta di un metodo di ionizzazione piuttosto che un altro dipende fondamentalmente da due fattori:

- dal tipo di informazioni richieste dall'analisi;
- dalla natura del campione da analizzare.

Sulla base di ciò, qualora si desideri ottenere informazioni strutturali della molecola saranno privilegiate tecniche energetiche che determinano la frammentazione e produzione di ioni della specie molecolare (*Hard ionization*). Al contrario, in presenza di analiti particolarmente labili dal punto di vista strutturale, o in cui lo ione molecolare frammenta totalmente (o quasi) ed è necessario avere informazioni sul peso molecolare della molecola, saranno privilegiate tecniche non distruttive (*Soft ionization*).

Le tecniche di ionizzazione hard sono ormai limitate alla sola ionizzazione elettronica (o impatto elettronico, EI), anche se prima molto diffuse erano anche la ionizzazione chimica (CI) e la ionizzazione di campo (Field ionization). Queste tecniche risultano appropriate per la ionizzazione in fase gassosa, per cui il loro uso è limitato a composti sufficientemente volatili e termicamente stabili. Comunque, numerosi composti chimici sono termicamente labili e non possiedono sufficiente tensione di vapore, per cui necessitano di altre tipologie di sorgenti ioniche, quali le sorgenti ioniche dirette che estraggono direttamente gli ioni dalla fase condensata a quella gassosa. Nelle sorgenti ESI (Electrospray Ionization), APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) e APPI (Atmospheric Pressure Photoionization) l'analita è in soluzione e vi è introdotto mediante un

processo di nebulizzazione dove gli ioni sono prodotti a pressione atmosferica e focalizzati all'interno dello spettrometro di massa attraverso una fase di pompaggio sottovuoto. In alcuni tipi di sorgenti (desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI; desorbimento a plasma, Plasma Desorption, PDMS; desorbimento di campo, Field desorption, FD; bombardamento con atomi veloci, Fast Atom Bombardment, FAB) l'analita è in un deposito non volatile, che può essere un solido o un fluido viscoso. Il deposito è irradiato da particelle energetiche o fotoni che desorbono gli ioni vicino la superficie. Gli ioni sono estratti da un campo elettrico e successivamente focalizzati verso l'analizzatore.

Le tecniche di ionizzazione di più largo impiego sono, per quanto riguarda la cromatografia liquida, la ionizzazione electrospray.

In questo capitolo saranno approfonditi gli aspetti riguardanti la tipologia di sorgente ionica ESI, oggetto della sperimentazione della presente tesi.

5.1.1) Ionizzazione elettrospray (ESI)

Lo sviluppo della tecnica ESI-MS ha inizio dalla metà degli anni '80, quando si era reso necessario lo sviluppo di una tecnica in grado di misurare precisamente la massa molecolare di importanti macromolecole quali le proteine, molecole polari, non volatili e termicamente labili. Tecniche allora disponibili per la ionizzazione di biomolecole, quali la tecnica FAB (Fast Atom Bombardment), producevano prevalentemente ioni carichi singoli, rendendo impossibile, se non previa digestione, l'analisi di macromolecole con un peso molecolare maggiore ai 1000 Da come le proteine. Tutti questi problemi furono superati nel 1989 quando Fenn introdusse la ionizzazione elettrospray, una tecnica di ionizzazione soft, in grado di ionizzare specie chimiche intatte mediante caricamento

multiplo ^[150]. Con questo tipo di ionizzazione soft, solo un piccolo residuo di energia è ritenuto dall'analita, e non comporta la frammentazione tipica invece delle tecniche di ionizzazione quali l'impatto elettronico o la ionizzazione chimica. Sebbene lo sviluppo della tecnica ESI-MS abbia avuto un impatto maggiore nella proteomica, le sue applicazioni si sono rapidamente estese ad un ampio range di analiti inclusi gli analiti organici. L'interfacciamento dell'HPLC con la tecnica spettrometrica di massa ESI-MS ha dato origine ad un potente sistema di analisi di molecole organiche di basso o alto peso molecolare e di varia polarità in campioni complessi come le matrici biologiche.

Una rappresentazione schematica della sorgente ESI è mostrata in Figura 1.

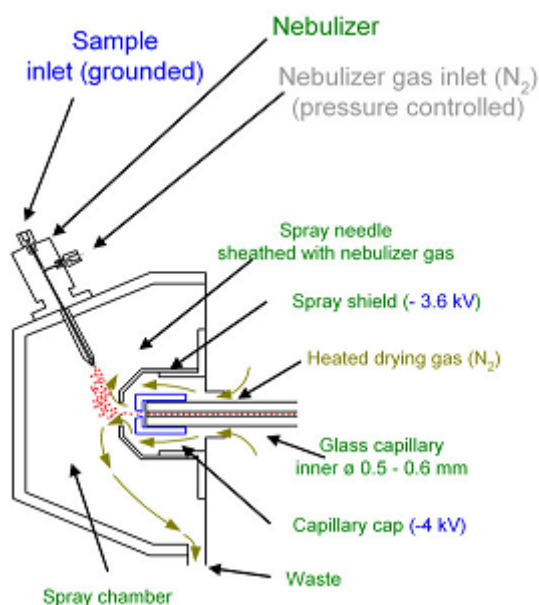


Figura 1: Rappresentazione schematica di una sorgente Elettrospray

Quando un analita è trasferito da una soluzione alla fase gassosa, la soluzione contenente l'analita va incontro a tre processi principali (Figura 2) ^[148]:

1) *Produzione di goccioline cariche*: quando la soluzione contenente l'analita è pompata attraverso il capillare ad alto voltaggio (“*emitter*”),

avviene una reazione elettrochimica del solvente che causa un flusso elettronico verso, o da, il capillare metallico a seconda della sua polarità. In assenza di analiti attivi dal punto di vista redox, in ionizzazione a polarità positiva avviene una ossidazione del solvente; viceversa, in ionizzazione a polarità negativa avviene una riduzione del solvente. Queste reazioni redox forniscono ioni positivi o negativi in soluzione a seconda della polarità dell'elettrodo emitter. Generalmente solventi polari, come acqua, metanolo, acetonitrile, che facilmente vanno incontro a reazioni elettrochimiche nell'ugello vaporizzatore, sono usati in ESI-MS. Le cariche accumulate (positive o negative) saranno respinte dal capillare ad alto voltaggio (della stessa polarità), e saranno direzionate verso la superficie del liquido all'uscita del capillare. Comunque, le cariche accumulate alla superficie sono destabilizzate e, a causa dell'influenza del campo elettrico molto alto (generalmente 10^6 V/m), la soluzione all'uscita tenderà a deformarsi e a formare il caratteristico *Cono di Taylor*, una zona ad alta turbolenza. Inizia così ad essere espulso un sottile getto di liquido dall'apice del cono di Taylor verso un controlettrodo (o capillary riscaldato).

3) *Esplosione Coulombiana e disintegrazione delle goccioline cariche*: le cariche delle goccioline sono distribuite sulla superficie della goccia stessa in maniera equidistante per minimizzare l'energia potenziale. Ci sono due forze che agiscono in direzione opposta. Da un lato c'è la tensione superficiale delle gocce cariche, che cerca di mantenere la forma sferica delle gocce; dall'altra c'è la forza di repulsione di Coulomb, che interessa le stesse cariche sulla superficie del liquido, e che cerca di distruggere la forma sferica delle goccioline cariche. L'evaporazione del solvente avviene quando le goccioline attraversano lo spazio tra l'ugello vaporizzatore e il capillare riscaldato. Quando il diametro delle goccioline diminuisce oltre un certo limite (limite di Rayleigh), in cui la tensione

superficiale non riesce più a sostenere le forze di repulsione, avviene la cosiddetta “Esplosione Coulombiana” o “Fissione di Coulomb”. Durante questo processo le gocce parentali si disintegrano in goccioline sempre più piccole. Questo processo si ripete molte volte fino alla generazione di nanogocce, da cui hanno origine gli analiti carichi in fase gassosa.

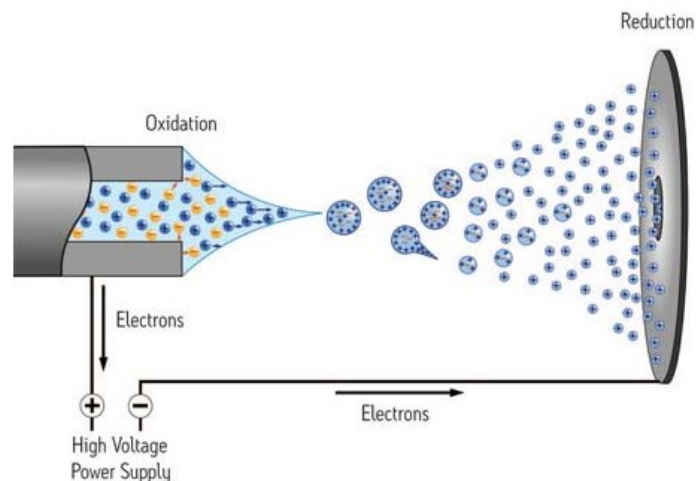


Figura 2: Schematizzazione del processo di nebulizzazione e formazione degli ioni in fase gassosa.

4) *Formazione degli ioni in fase gassosa*: sono stati proposti due meccanismi.

- Modello del residuo carico (Dole et al. Molecular beams of macroions): come risultato di una serie di evaporazione del solvente e fissione colombiana, sono formate delle goccioline di dimensioni estremamente piccole ($R = \text{circa } 1 \text{ nm}$), contenenti solo una molecola di analita. La desolvatazione della gocciolina carica fa sì che la carica superficiale vada a collocarsi sull’analita stesso e sia così ritenuto dalla molecola.
- Modello di evaporazione ionica: dopo ripetute evaporazioni del solvente e fissioni di Coulomb, il raggio delle goccioline cariche decresce ad una certa

dimensione quando il campo elettrico dovuto alla carica superficiale della goccia è forte abbastanza da causare diretta emissione di ioni solvatati.

5.2) *L'analizzatore di massa*

L'analizzatore di massa rappresenta il cuore dello spettrometro di massa, in cui avviene la selezione degli ioni formati nella sorgente di ionizzazione sulla base del loro rapporto massa/carica (m/z). Poiché nella maggior parte dei casi la carica degli ioni è +1, la separazione avviene in base alle rispettive masse ($M/1$). Gli ioni, prodotti nella camera di ionizzazione nella sorgente ionica, sono trasferiti nella regione dell'analizzatore di massa mediante diversi elementi elettromagnetici come skimmer, lenti focalizzatrici, multipoli, etc., con lo scopo di focalizzare la corrente ionica e mantenere una traiettoria stabile degli ioni. Gli ioni separati giungono al detector per la misura dell'intensità del segnale ionico, e il detector restituisce l'output strumentale sottoforma di *spettro di massa*.

In uno dei primi analizzatori, realizzato ricorrendo a campi elettrici accoppiati a campi magnetici (spettrometro a doppia focalizzazione elettromagnetica), il campo elettrico accelera gli ioni inviandoli in un condotto ricurvo, e il campo magnetico induce una deflessione del percorso degli ioni accelerati in base alla loro massa.

Dal momento che gli ioni in fase gassosa sono molto reattivi e possiedono vita breve, la loro formazione e manipolazione è condotta in condizioni di alto vuoto (pressioni di 10^{-3} - 10^{-6} torr) per mezzo di pompe rotative. Differentemente, la sorgente ionica è generalmente mantenuta a pressione atmosferica (ESI).

Così come per le sorgenti di ionizzazione, la tecnologia in questo settore ha portato allo sviluppo di vari tipi di analizzatori, dotati di caratteristiche diverse e con performance sempre maggiori.

Sulla base della modalità di selezione degli ioni è possibile classificare gli analizzatori di massa in:

- Analizzatori a deflessione magnetica;
- Analizzatori a quadrupolo;
- Analizzatori a trappola ionica;
- Analizzatori a tempo di volo (TOF);
- Analizzatori a risonanza ciclotronica ionica (FT-ICR).

Di seguito saranno riportate nello specifico soltanto le caratteristiche dell'analizzatore a tempo di volo, oggetto della sperimentazione della presente tesi.

5.2.1) Analizzatore a tempo di volo (TOF)

Il concetto alla base dell'analizzatore a tempo di volo (Time of Flight, TOF) risale alla metà degli anni quaranta quando Stephens suggerì che uno spettrometro di massa poteva essere realizzato con un campo elettrico in grado di separare i pacchetti di ioni sulla base del diverso rapporto m/z . Un analizzatore a tempo di volo assicura un'elevata sensibilità, poiché tutti gli ioni generati dalla sorgente arrivano al detector (al contrario di altri analizzatori che funzionano invece come filtro). La semplicità dei principi su cui si basa può dare in parte una spiegazione del suo attuale successo.

Un "pacchetto" di ioni viene emesso da una sorgente in un tempo molto breve e vengono ugualmente accelerati, attraverso l'applicazione di un campo elettrico lungo una regione di deriva libera dal campo (*fly tube*, tubo di volo). Idealmente gli ioni entrano nel tubo di volo con la stessa energia cinetica, tuttavia, il tempo impiegato per percorrere il tubo di volo, misurato in microsecondi, viene trasformato nel valore di massa dello ione sulla base della relazione dell'energia cinetica delle molecole ($mv^2/2$). Ne consegue che la velocità con cui gli ioni viaggiano all'interno

dell'analizzatore dipende solo dal loro rapporto m/z e gli ioni più piccoli raggiungeranno prima il detector e viceversa. Il tempo che occorre alla particella per attraversare la regione di deriva è quindi registrato e, dato che la velocità dello ione dipende dal rapporto massa/carica (m/z), da questo tempo e dai parametri sperimentali noti si può calcolare il rapporto m/z dello ione ^[151].

Gli analizzatori TOF di tipo lineare garantiscono un'elevata sensibilità, ma una risoluzione abbastanza scarsa che diminuisce all'aumentare delle dimensioni dell'analita. La risoluzione è stata migliorata con l'introduzione di analizzatori TOF “*reflector*”, nel quale gli ioni devono compiere una traiettoria più lunga, rispetto al precedente, prima di raggiungere il rivelatore, in modo tale che gli ioni possano essere meglio separati. Il reflectron è costituito da un serie di anelli e/o griglie a voltaggi crescenti (in modalità positiva) ed è posizionato alla fine della regione di deriva priva di campo. Gli ioni, penetrano il reflectron finché non raggiungono energia pari a zero, tornano indietro e sono riaccelerati attraverso il reflectron stesso dal quale escono con un'energia pari alla loro energia di ingresso. Si ottiene in questo modo una risoluzione ottimale quando il tempo aggiuntivo speso dagli ioni più veloci nel reflectron è pari al tempo aggiuntivo speso dagli ioni più lenti nella regione di accelerazione primaria e nel tubo di volo.

Questi strumenti consentono, inoltre, di ottenere risoluzioni isotopiche. Si ricorda che gli isotopi di un elemento presentano lo stesso numero atomico ma un diverso numero di massa, per cui differiscono per il numero di neutroni e quindi per il loro peso. In natura, infatti, gli elementi sono in genere costituiti da miscele di isotopi.

Come collettore e rivelatore degli ioni, il TOF utilizza comunemente un moltiplicatore elettronico, costituito da una serie di elettrodi in cascata. Quando uno ione arriva sul primo elettrodo questo emette un fascio di

elettroni che vanno a colpire il secondo elettrodo, il quale a sua volta emette una quantità maggiore di elettroni e così via. Il risultato è una forte amplificazione del segnale che viene poi digitalizzato ed elaborato infine dal calcolatore dello spettrometro per la presentazione dello spettro di massa.

5.3) Spettro di massa ESI-TOF

Gli spettri di massa vengono rappresentati spesso in forma di semplici istogrammi a due dimensioni, in cui l'intensità del segnale ionico è riportato in funzione del rapporto m/z . Il rapporto m/z rappresenta la massa di una data particella (misurata in Dalton, *Da*) rispetto al numero di cariche elettrostatiche che la particella porta. In uno spettrometro di massa ESI-TOF, gli ioni, rilevati nella loro forma protonata o deprotonata, e la loro intensità relativa permettono di stabilire il peso molecolare di una molecola e la sua concentrazione. Il livello di informazione che è possibile ottenere da uno spettrometro di massa, dipende non solo dalla modalità di ionizzazione ma anche dal suo potere risolutivo. Una strumentazione ad alta risoluzione, come quello utilizzato nella presente tesi, dipende dal suo potere risolutivo, cioè dalla sua capacità di separare due picchi con masse diverse. Dunque, differentemente da strumenti a bassa risoluzione che forniscono la massa nominale (intera) degli ioni, uno strumento ad alta risoluzione fornisce la massa esatta degli ioni, che in genere definisce univocamente la composizione elementare degli ioni corrispondenti.

Un altro principio che permette di risalire alla formula bruta di una sostanza, caratteristico degli spettrometri di massa ad alta risoluzione, è la capacità di valutare l'intensità degli isotopi relativi al picco molecolare. La maggior parte degli elementi che compongono i composti organici possiede diversi isotopi naturali, di cui di solito il più leggero è quello più

abbondante. Perciò, dallo studio dei picchi isotopici e conoscendo le percentuali di abbondanza naturale dei vari isotopi, è possibile risalire alla formula molecolare di un composto.

CAPITOLO 6
FASE SPERIMENTALE

Fase sperimentale

Da un punto di vista analitico, il presente lavoro persegue diversi obiettivi:

- Identificazione dei cannabinoidi sintetici e classificazione sotto il profilo chimico-strutturale.
- Sviluppo di metodiche analitiche in cromatografia liquida e gassosa con rivelatore di massa ad alta risoluzione.
- Studio di stabilità strutturale dei cannabinoidi sintetici nel fluido orale, in seguito a simulazione del processo di smoking mediante Homemade Cigarette Smoking-Machine, in diverse condizioni di catena di custodia ($T_1 = RT = 25 \pm 2^\circ\text{C}$, $T_2 = 4^\circ\text{C}$, $T_3 = -20^\circ\text{C}$) fino ad un tempo di 10 giorni e a diversi intervalli di tempo ($t = 0 \text{ h}$, 24 h , 48 h , 120 h e 240 h).

6.1) Materiali

6.1.1) Composti chimici e reagenti

Tutti gli standard analitici certificati (100 $\mu\text{g/ml}$) sono stati forniti dal Ministero della Sanità, eccetto lo standard MO-CHMINACA (1 mg/ml), acquistato da *Bertin Pharma*. L'acetonitrile (*Panreac*), utilizzato come fase mobile durante la separazione cromatografica, è un solvente HPLC-grade. L'acido formico (puris. p. a. eluent additive for LC-MS ~ 98%) è stato fornito da *Fluka Analytical*. L'ammonio formiato (*Fluka Analytical*), l'idrossido di sodio (*Aldrich*), l'isopropanolo (*Carlo Erba*) sono stati utilizzati per la preparazione del calibratore del rilevatore di massa.

6.2) Metodi

6.2.1) Classificazione chimico-strutturale

Le risorse utilizzate per lo studio e la classificazione chimico-strutturale dei cannabinoidi sintetici derivano da fonti online tra cui materiale divulgato da *Dipartimento Politiche Antidroga*, *Cayman Chemical*, *SWG-DRUGS* (*Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs*), *SAFS-Forendex* (*Southern Association of Forensic Scientist*), oltre che da letteratura scientifica.

6.2.2) Studio di stabilità strutturale

È stata valutata, mediante simulazione del processo di smoking, la stabilità strutturale di sei cannabinoidi sintetici nel fluido orale, ciascuno riconducibile ad una diversa classe chimica, in tre diverse condizioni di catena di custodia ($T_1 = RT = + 25 \pm 2^\circ\text{C}$, $T_2 = + 4^\circ\text{C}$, $T_3 = -20^\circ\text{C}$) e a diversi intervalli di tempo, fino a dieci giorni ($t = 0 \text{ h}$, 24 h , 48 h , 120 h e 240 h).

Il fluido orale (bianco) è stato ottenuto da diversi volontari del Laboratorio di Tossicologia Forense, fumatori e non, al fine di ottenere un pool di campioni il più possibile eterogeneo. La simulazione del processo di smoking e la preparazione analitica del fluido orale sono state eseguite come descritto nei paragrafi successivi.

Il recupero degli analiti d'interesse è stato calcolato mediante comparazione dell'intensità del segnale ionico della molecola protonata nel campione T_0 con quella rilevata nei campioni sottoposti a catena di custodia, ed espresso in percentuale (%).

6.2.3) *Homemade cigarette-smoking machine*

È stata realizzata in laboratorio una macchina da fumo in grado di riprodurre fedelmente il processo di assunzione dei cannabinoidi sintetici (smoking) da parte di un consumatore, con lo scopo di simulare la distribuzione dei principi attivi nel fluido orale (*Mainstream Smoke*) (Figura 1).

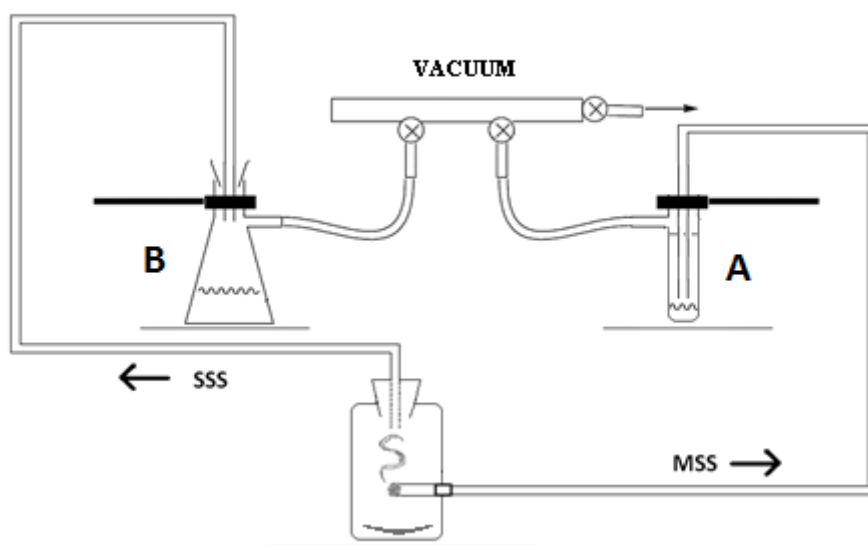


Figura 1: Rappresentazione schematica della macchina sviluppata in laboratorio per la simulazione del processo di smoking dei cannabinoidi sintetici.

Per il confezionamento della sigaretta sono stati utilizzati tabacco, e cartina comunemente commercializzati nei punti di vendita specializzati. 10 μg di cannabinoidi sintetici sono stati aggiunti al tabacco. Nello specifico, dalle soluzioni madre degli standard analitici certificati 1 mg/ml sono stati prelevati con microsiringa 10 μl e dalle soluzioni madre di standard analitici certificati 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sono stati prelevati con pipettatrice automatica 100 μl e depositati sul tabacco.

L'operazione è avvenuta sopra una piastra riscaldata per permettere l'evaporazione del solvente e dunque favorire la successiva combustione del tabacco. Al fine di standardizzare il più possibile le condizioni

operative in ciascuna sperimentazione, la pressione di aspirazione è stata mantenuta costante mediante una pompa per il vuoto (- 0.2 bar) mentre la durata dell'aspirazione della sigaretta (puff) è stata realizzata in 2 secondi, alternando 2 secondi tra un puff e l'altro; il mainstream smoke (MSS) e il sidestream smoke (SSS) sono stati, mediante l'utilizzo di tubi in teflon, convogliati e fatti gorgogliare rispettivamente all'interno di 2 ml di saliva (A) e di 10 ml di acetonitrile (B).

Per ciascuno dei diversi intervalli di tempo stabiliti ($t = 24$ h, 48 h, 120 h e 240 h), corrispondenti al tempo in cui la matrice biologica è lasciata a catena di custodia prima dell'analisi, è stata condotta una simulazione di combustione al termine delle quali il fluido orale è stato aliquotato in tre provette in polipropilene/vetro, ciascuna sottoposta a catena di custodia RT, 4°C e -20°C.

6.2.4) Preparazione analitica del fluido orale

Il fluido orale ricavato dalla sperimentazione di combustione (500 μ l) è stato trattato come segue. L'abbattimento dell'effetto matrice tipico della matrice salivare è stato effettuato mediante aggiunta di un egual volume di solvente organico (rapporto 1:1). Il campione è stato agitato (15 secondi di vortex) e centrifugato (5 minuti a 12000 rpm) per ottenere la precipitazione delle macromolecole sul fondo della provetta. Il sovranatante risultante è stato ulteriormente chiarificato mediante filtrazione con siringa ed apposito filtro (membrana PTFE, pore size 0,2 μ m) all'interno di una vial da HPLC. Dopo l'aggiunta di 20 μ l di acido formico 0,1 % (pH finale = 4) è stata eseguita l'analisi HPLC-ESI-TOF. 20 μ l di campione sono prelevati dall'autocampionatore ed introdotti, attraverso la fase mobile, in colonna e successivamente al rilevatore di massa.

6.2.5) HPLC-ESI-TOF

La sperimentazione LC-MS è stata effettuata utilizzando un sistema HPLC (*Ultimate 3000 Pump, Dionex*), compreso di autocampionatore (*Ultimate 3000 Autosampler Column Compartment, Dionex*), interfacciato con uno spettrometro di massa a tempo di volo TOF (*micrOTOF II, Bruker*), mediante interfaccia ESI (*Electrospray Ionization*).

La separazione cromatografica è stata realizzata in fase inversa su una colonna con fase stazionaria apolare (*EVO C₁₈, Phenomenex*). Il gradiente per l'eluizione degli analiti di interesse ha previsto l'utilizzo di due fasi cromatografiche:

Fase A: Ammonio formiato 2,5 mM + di Acido Formico, pH 4;

Fase B: Acetonitrile + 0,1% di Acido Formico, pH 4.

Il volume di iniezione è stato di 20 µl, mediante un sistema di iniezione a loop fisso. Il ciclo totale del processo cromatografico è stato realizzato ad un flusso di 0,15 ml/min per una durata complessiva di 27 minuti, tempo che permette un adeguato ricondizionamento della fase stazionaria. In Figura 2 sono indicati dettagliatamente le fasi mobili e il loro profilo in funzione del tempo.

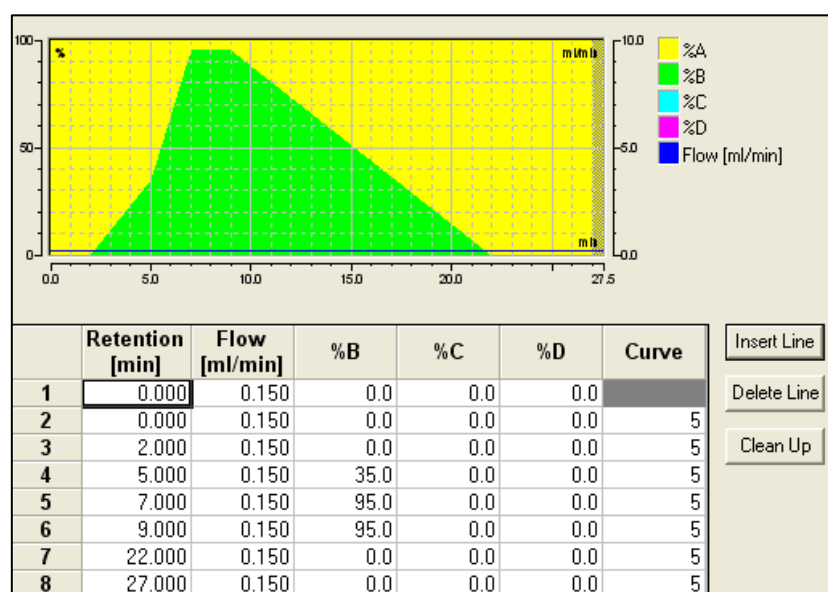


Figura 2: Gradiente cromatografico sviluppato per la separazione in HPLC.

Tutti i dati MS sono stati ottenuti in Positive Ion Mode, all'interno di un Mass Range da 100 a 800 m/z. I parametri della sorgente ESI sono i seguenti. Il voltaggio applicato allo *Spray Shield* è stato settato a - 500 V. Il voltaggio applicato al cap metallico del *Capillary* all'entrata nel sistema del vuoto è stato settato a - 4500 V. Per il flusso entrante in colonna impostato (0,15 ml/min), è stata applicata una pressione di nebulizzazione (*Nebulizer*) di 40 psi e un valore di velocità del flusso di azoto (*Dry Gas*) di 8 l/min, e una temperatura di 200 °C.

L'identificazione è stata basata sull'identificazione della massa protonata esatta $[M+H]^+$ fino alla quarta cifra decimale e la misurazione del pattern isotopico delle molecole di interesse, generata dal software *Compass IsotopePattern* utilizzando come input le formule brute molecolari. L'acquisizione LC-MS è stata ottenuta in *Full-Scan mode* (100-800 m/z) da cui il segnale ionico d'interesse (m/z) è estratto (*Extracted Ion Chromatogram, EIC*).

Il riconoscimento delle masse esatte è stato ottenuto mediante calcolo (*Smart Formula Manually*), considerando accettabile il riconoscimento di masse molecolari che, con una tolleranza bassa (Tolerance = 4) forniscono un riconoscimento pari al 100% (Score = 100%).

La calibrazione strumentale, ottenuta mediante soluzione di sodio formiato in polarità ionica positiva, è stata realizzata nella modalità *Enhanced Quadratic*, ottimizzando, in particolare, la misurazione nel range di massa 100-600 m/z. La qualità della calibrazione, necessaria per l'ottenimento di un'accuratezza della misurazione di massa adeguata, è stata apprezzata valutando l'errore in ppm della massa misurata in rapporto alla massa di riferimento del calibratore, e dal valore % dello *Score*, che esprime in percentuale la bontà della calibrazione. In particolare, sono stati considerati accettabili errori di massa (ppm) pari a $\pm 0,1-0,2$ ppm e *Score* > 99.95 %.

6.3) Validazione del dato

La validazione del metodo analitico-strumentale sviluppato ha incluso lo studio della selettività, dell'effetto matrice, del LOD, della linearità e del carry over.

La selettività è stata valutata analizzando campioni di fluido orale bianco, prelevato da diversi soggetti, per verificare la presenza di interferenze endogene al tempo di ritenzione degli analiti d'interesse.

La linearità strumentale è stata verificata analizzando le soluzioni di analita standard certificate a diverse concentrazioni, valutando la risposta strumentale in termini di intensità ionica.

Il limite di rilevazione (LOD) è stato stimato come la concentrazione dell'analita la cui risposta strumentale fornisce un rapporto segnale/rumore (S/N) uguale a 3.

È stato valutato il limite di quantificazione (LOQ) del metodo come la concentrazione dell'analita la cui risposta fornisce un rapporto $S/N \geq 10$.

L'effetto matrice è stato valutato quantitativamente, come descritto da Matuszewski et al, mediante il calcolo del fattore matrice, secondo l'equazione ^[152]:

$$\text{Fattore Matrice (MF)} = \frac{\text{Risposta dell'analita nella matrice}}{\text{Risposta dell'analita nella fase mobile}}$$

MF = 1 (nessun effetto matrice)

MF > 1 (innalzamento del segnale ionico)

MF < 1 (soppressione del segnale ionico)

La stima di questo fenomeno è stata effettuata comparando la risposta del picco dell'analita nel fluido orale, prelevato da diversi soggetti, con quella

di una soluzione standard contenente le molecole d'interesse alla stessa concentrazione.

Il fenomeno di trascinamento analitico (carry over) è stato verificato interponendo delle soluzioni di solventi (bianco) tra una corsa cromatografica e l'altra, a concentrazioni crescenti di analita.

CAPITOLO 7
RISULTATI E DISCUSSIONI

Risultati e discussioni

La stabilità chimico-strutturale delle molecole di interesse forense è parte fondamentale di un processo analitico, tanto che lo sviluppo di un nuovo metodo per l'isolamento, l'identificazione e la quantificazione di una determinata sostanza deve essere necessariamente accompagnato da studi di stabilità dell'analita stesso. Ogni molecola è caratterizzata da una certa reattività ad agenti chimici e fisici che dipende dalla natura chimica della molecola stessa.

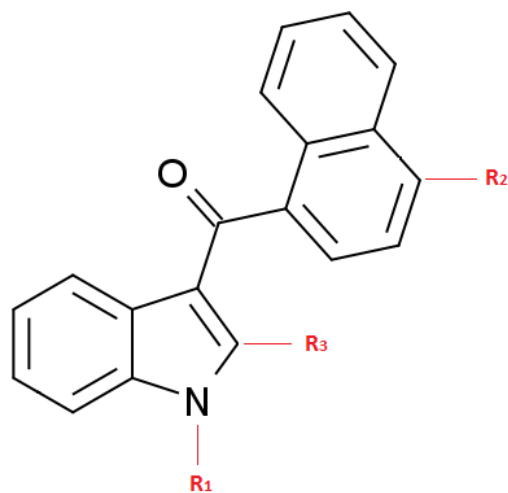
Così come per la cannabis, fin dai tempi più remoti, anche per i cannabinoidi sintetici, il “rito” del fumo rimane il mezzo di assunzione preferito dal consumatore/abusatore, sebbene oggi altri dispositivi stiano emergendo sul mercato (e-cigarette) ^[55]. La combustione del tabacco, processo che avviene a temperature comprese tra gli 800-880°C, produce un aerosol complesso in cui i costituenti del fumo sono ripartiti in due fasi: una centrale (*Mainstream Smoke, MSS*) e una laterale (*Sidestream Smoke, SSS*) ^[153]. Come descritto nel capitolo precedente, la fase MSS prodotta dalla macchina del fumo, è stata fatta fluire all'interno di un vial contenente saliva, successivamente aliquotata in tre provette con tappo a vite e sottoposta a diversa catena di custodia (RT = 25°C ±2, 4°C e -20°C) prima dell'analisi tossicologica.

Nel presente lavoro è stata indagata la stabilità strutturale, in seguito al processo di smoking, di sei cannabinoidi sintetici (JWH-147, JWH-203, JWH-081, AM2233, CB-13, MO-CHMINACA), ognuno riconducibile ad una specifica classe chimico-strutturale.

Tutte le molecole oggetto di indagine nello sviluppo del metodo analitico-strumentale sono illustrate in Figura 1. In blu sono evidenziate le molecole selezionate per lo studio di stabilità strutturale.

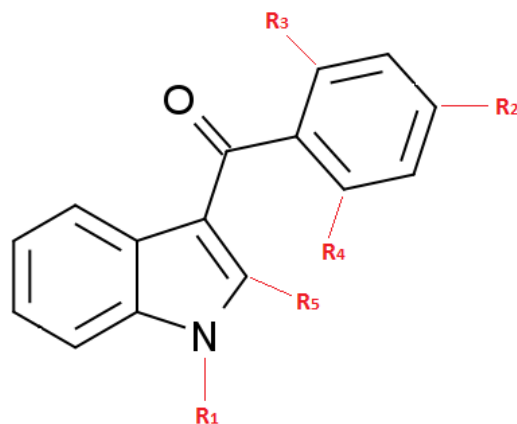
- 1- Naftoilindoli (Figura 1a)
- 2- Benzoilindoli (Figura 1b)
- 3- Fenilacetilindoli (Figura 1c)
- 4- Naftoilpirroli (Figura 1d)
- 5- Naftoilnaftalene (Figura 1e)
- 6- Esteri indazolo-3-carbossilati (Figura 1f)

a)



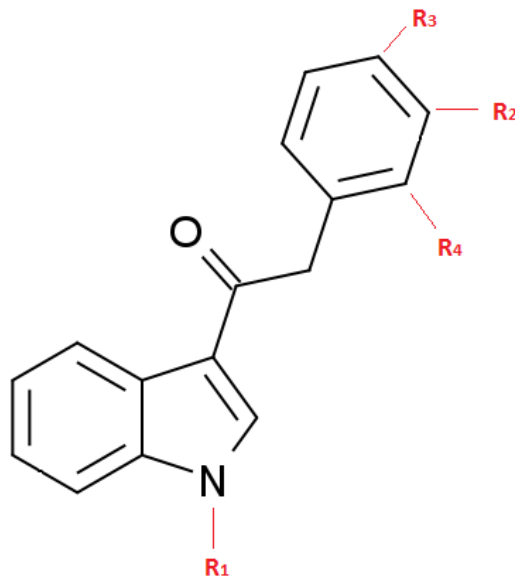
n°	Molecola	Formula bruta	MW (g/mol)	[M+H] ⁺	R ₁	R ₂	R ₃
1	AM2201	C ₂₄ H ₂₂ FNO	359	360.1758	F-pentile	H	H
2	JWH-016	C ₂₄ H ₂₃ NO	341	342.1852	Butile	H	Me
3	JWH-019	C ₂₅ H ₂₅ NO	355	356.2008	Esile	H	H
4	JWH-081	C₂₅H₂₅NO₂	371	372.1958	Pentile	O-Me	H
5	JWH-210	C ₂₆ H ₂₇ NO	369	370.2165	Pentile	Et	H
6	JWH-398	C ₂₄ H ₂₂ ClNO	375	376.1462	Pentile	Cl	H

b)



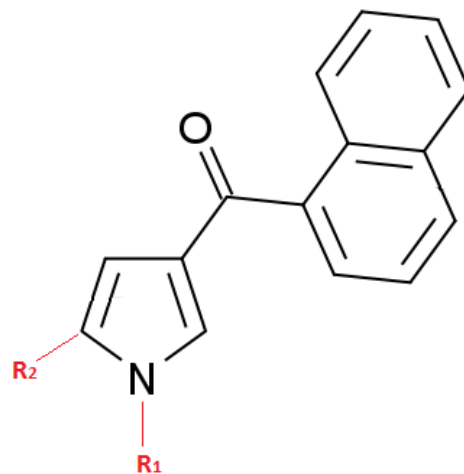
n°	Molecola	Formula bruta	MW (g/mol)	[M+H] ⁺	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
7	AM694	C ₂₀ H ₁₉ FINO	435	436.0568	F-pentile	O-Me	I	H	H
8	AM2233	C₂₂H₂₃IN₂O	458	459.0927	1-(N-methyl-2-piperidinyl)methyl	H	H	I	H
9	Pravadolina	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₃	378	379.2016	2-(4-morpholinyl)ethyl	O-Me	H	H	Me
10	RCS-4	C ₂₁ H ₂₃ NO ₂	321	322.1801	Pentile	O-Me	H	H	H

c)



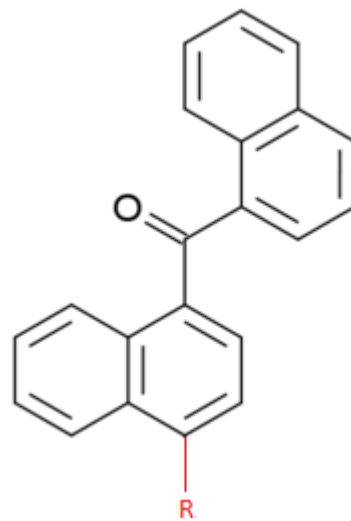
n°	Molecola	Formula bruta	MW (g/mol)	$[M+H]^+$	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
11	JWH-203	C₂₁H₂₂ClNO	339	340.1462	Pentile	H	H	Cl
12	JWH-302	C ₂₂ H ₂₅ NO ₂	335	336.1958	Pentile	O-Me	H	H
13	RCS-8	C ₂₅ H ₂₉ NO ₂	375	376.2271	Cicloesil-etile	H	O-Me	H

d)



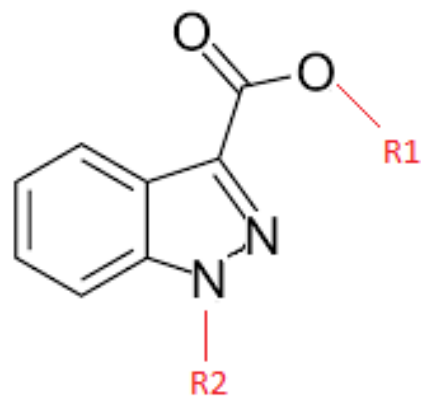
n°	Molecola	Formula bruta	MW (g/mol)	[M+H] ⁺	R ₁	R ₂
14	JWH-147	C₂₇H₂₇NO	381	382.2165	Esile	fenil
15	JWH-307	C ₂₆ H ₂₄ FNO	385	386.1914	Pentile	F-fenil

e)



n°	Molecola	Formula bruta	MW (g/mol)	[M+H] ⁺	R
16	CB-13	C ₂₆ H ₂₄ O ₂	368	369.1849	O-Pe

f)



n°	Molecola	Formula bruta	MW (g/mol)	[M+H] ⁺	R ₁	R ₂
17	MO-CHMINACA	C₂₆H₂₄O₂	386	387.2278	3,3-dimetilbutil metil estere	Cicloesilmetile

Figura 1: Rappresentazione dei cannabinoidi sintetici utilizzati nella sperimentazione, suddivisi per classe chimica: a) Naftoilindoli, b) Benzoilindoli, c) Fenilacetilindoli, d) Naftoilpirroli, e) Naftoilnaftaleni, f) Esteri indazolo-3-carbossilati. In blu sono evidenziati i cannabinoidi sintetici selezionati per lo studio di stabilità strutturale.

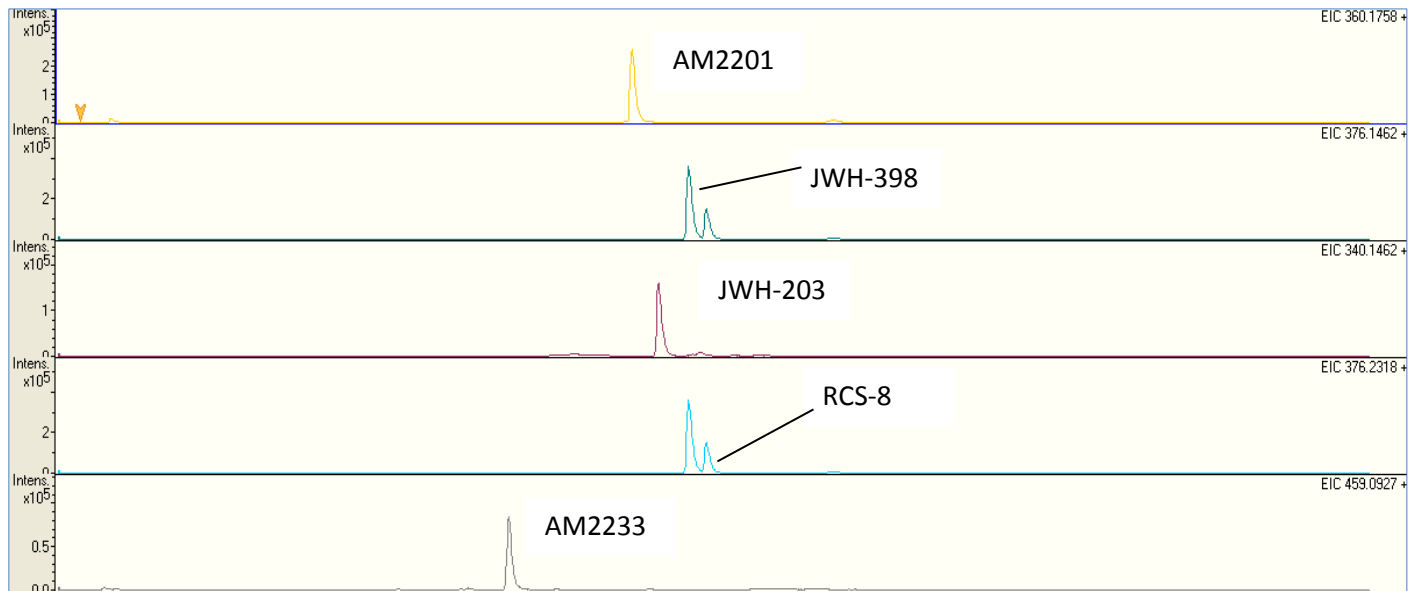
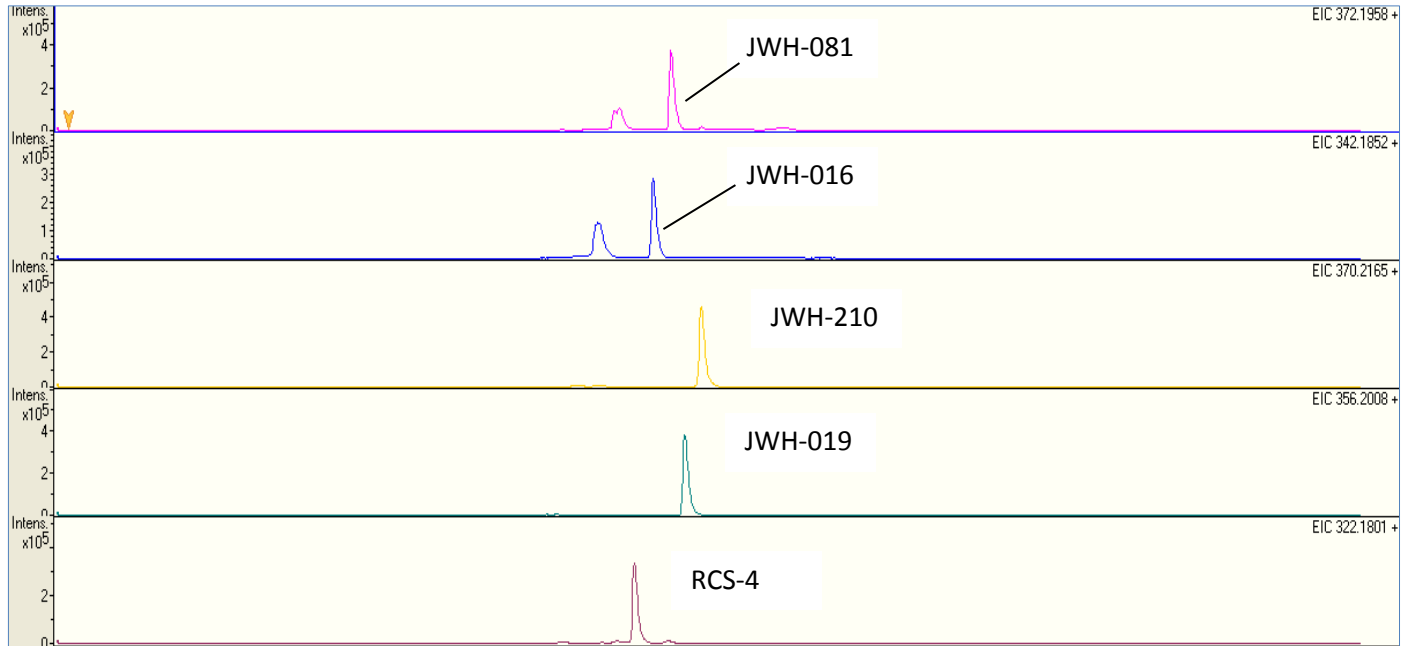
7.1) Ottimizzazione del metodo analitico-strumentale

Il metodo analitico strumentale sviluppato consiste nell'analisi in spettrometria di massa ad alta risoluzione con separazione cromatografica liquida: HPLC-ESI-TOF. Questa tecnica analitica, altamente specifica nella identificazione e quantificazione di molecole organiche incognite a concentrazioni picomolari, consente la generazione della formula bruta e della massa molecolare esatta. La possibilità di ottenere un tale risultato dipende da un corretto processamento della matrice biologica per limitare al massimo il cosiddetto *Effetto Matrice*. La mancata considerazione di tale effetto durante lo sviluppo di un metodo analitico-strumentale conduce ad un dato inaffidabile in termini di precisione ed accuratezza e la purificazione non corretta del campione può determinare la perdita dell'analita d'interesse (soppressione ionica).

Il trattamento di ogni singolo campione salivare è stato effettuato secondo il protocollo analitico descritto nel capitolo precedente. Poiché il fluido orale è una matrice altamente viscosa e biologicamente eterogenea richiede necessariamente un pretrattamento. La scelta dell'acetonitrile, solvente polare aprotico, scaturisce dal fatto che la sua natura chimica determina l'abbassamento del valore della costante dielettrica del mezzo acquoso favorendo le interazioni elettrostatiche proteina-proteina con successiva aggregazione e precipitazione.

Il gradiente della fase mobile sviluppato ha consentito di ottenere la separazione degli analiti d'interesse, rappresentati dai corrispondenti picchi cromatografici, con una risoluzione ottimale per la generazione delle formule brute corrispondenti.

I risultati ottenuti sono mostrati in Figura 2.



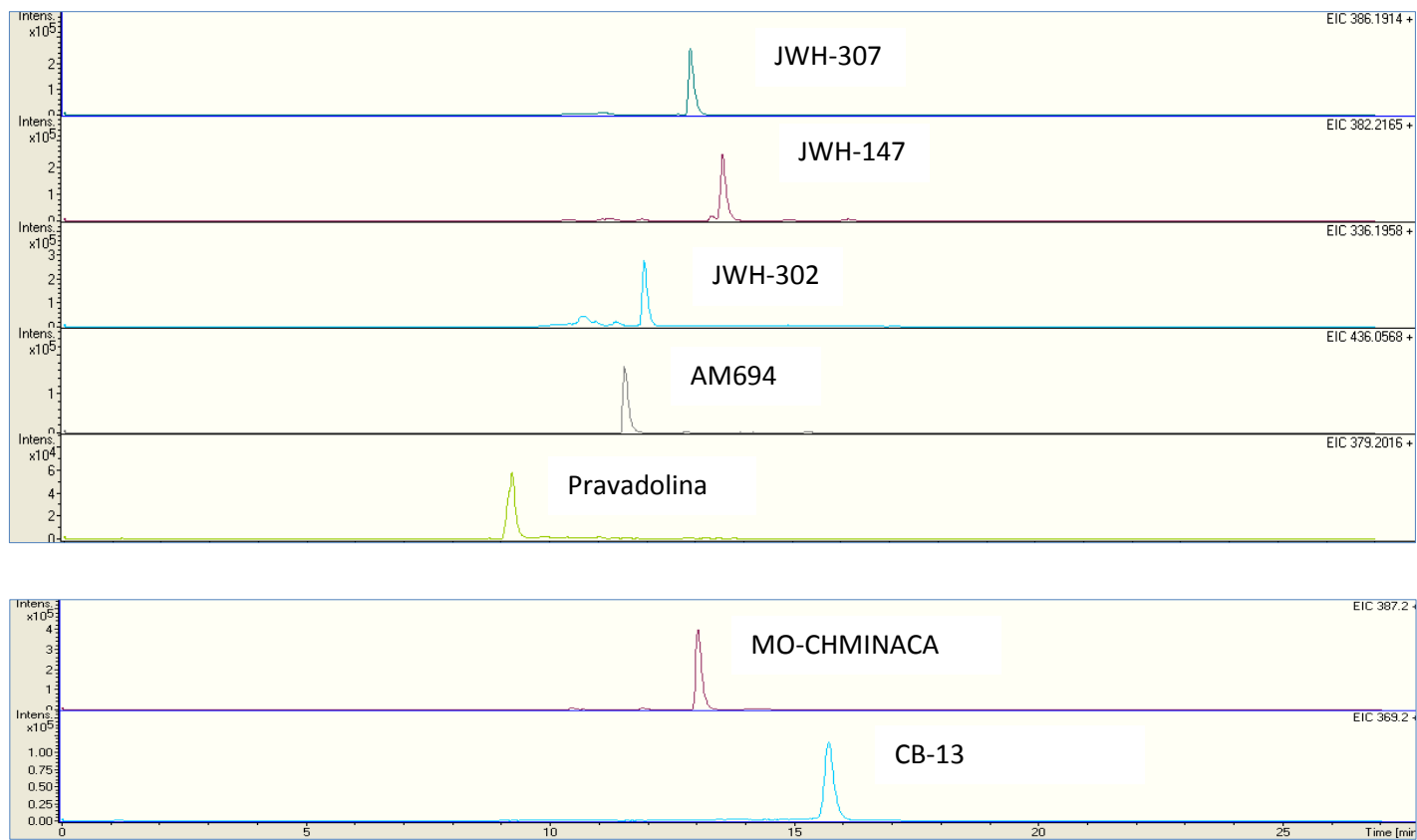


Figura 2: Separazione cromatografica dei cannabinoidi sintetici sottoposti ad indagine (*EVO C₁₈, Phenomenex*).

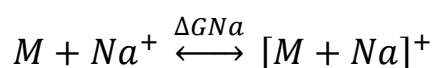
Confrontando i valori della massa di ciascun analita ottenuti mediante isotope pattern $[M+H]^+$ con quelli ottenuti strumentalmente, è stato possibile identificare con certezza ciascuna molecola d'interesse (Tab. 1).

Molecola	RT (min)	$[M+H]^+$ calcolata	$[M-H]^+$ sperimentale	Δ mDa
AM2201	11.9	360.1758	360.1774	0,0016
JWH-016	12.5	342.1852	342.1873	0,0021
JWH-019	13.1	356.2008	356.2031	0,0023
JWH-081	12.8	372.1958	372.1986	0,0028
JWH-210	13.5	370.2165	370.2200	0,0035
JWH-398	13.5	376.1462	376.1486	0,0024
AM694	11.6	436.0568	436.0620	0,0052
AM2233	9.3	459.0927	459.0977	0,0050
Pravadolina	9.3	379.2016	379.2075	0,0059
RCS-4	12.0	322.1801	322.1847	0,0046
JWH-203	12.4	340.1462	340.1523	0,0061
JWH-302	12.0	336.1958	336.2043	0,0085
RCS-8	13.0	376.2271	376.2318	0,0047
JWH-147	13.6	382.2165	382.2222	0,0057
JWH-307	12.9	386.1914	386.2000	0,0086
CB-13	15.9	369.1849	369.1901	0,0052
MO- CHMINACA	13.1	387.2278	387.2333	0.0055

Tabella 1: Valori di massa accurata ottenuti sperimentalmente per i cannabinoidi sintetici $[M+H]^+$; dal confronto con i valori di riferimento è stata ottenuta la differenza di massa in mDa.

7.1.1) Spettro di massa ESI⁺-TOF di MO-CHMINACA

Nelle sorgenti a ionizzazione per elettronebulizzazione (*Soft Ionization*), la formazione di uno ione molecolare integro ($[M+H]^+$) è direttamente condizionata dalla tensione fornita al capillare dell'elettrospray e dalla struttura della molecola in analisi. Il nostro studio conferma che la presenza nelle molecole di atomi fortemente elettronegativi, determina la formazione, in ionizzazione elettrospray, di uno ione molecolare addotto con il Sodio per interazione elettrostatica ione-dipolo secondo l'equazione:



L'adduzione metallica è un processo indesiderato in LC-MS, spesso difficile da contrastare perché indipendente dalle operazioni dell'analista. La più comune fonte di contaminazione metallica è, infatti, la vetreria di laboratorio, in quanto il sodio, utilizzato nel processo di produzione, viene rilasciato in presenza di solventi acquosi, ma non sono da escludere altre vie di contaminazione, come ad esempio alcuni solventi HPLC grade (0.1 ppm). I campioni biologici hanno generalmente alte concentrazioni endogene di vari sali tra cui il sodio: in particolare, campioni urinari o plasmatici di pazienti clinici possono presentare un'elevata variabilità nella concentrazione salina e la loro presenza, sotto il profilo analitico-strumentale, può portare a risultati quantitativi inaccurati.

Lo studio attento dello spettro ESI⁺-TOF di MO-CHMINACA (Figura 3), ottenuto ottimizzando il potenziale del *Capillary Exit* a 100 V, evidenzia sia la protonazione dello ione molecolare m/z 387.2 che la formazione dello ione m/z 409.2 (addotto del sodio).

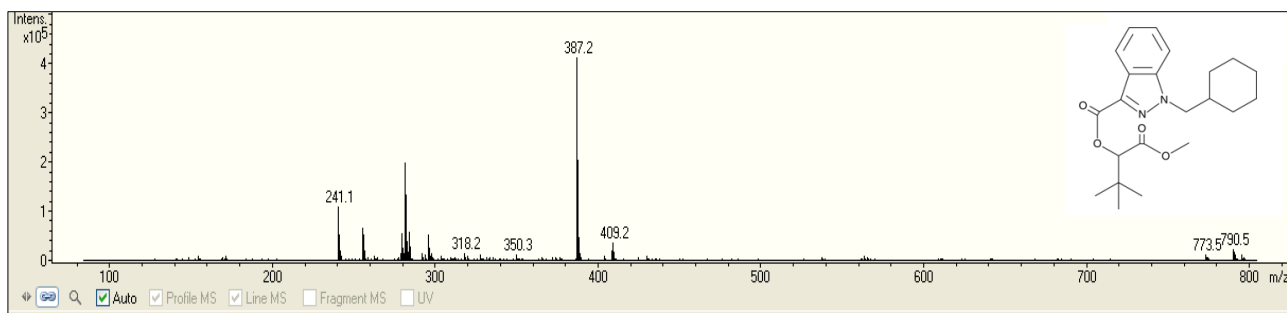


Figura 3: Spettro di massa ESI⁺ di MO-CHMINACA, ottenuto ottimizzando la tensione al capillary exit a 100 V. In tali condizioni lo ione molecolare protonato della molecola emerge dallo spettro, anche se parte dell'analita rimane complessata al sodio ($m/z = 409$)

Gli effetti di un eccesso di potenziale al capillary (151,7 V) sono documentati nella Figura 4: lo ione molecolare protonato $[M+H]^+$ di MO-CHMINACA risulta diminuito in termini di *Ion Counts* in quanto emergono, con intensità 10^5 , ioni frammento dello stesso aventi rispettivamente massa m/z 241.1 e 145.0, prodotti di una pseudoframmentazione dello ione M^+ (386.5). Come evidenziato in figura, indipendentemente dal voltaggio applicato, lo spettro di massa risulta caratterizzato sempre dalla presenza dell'addotto cationico.

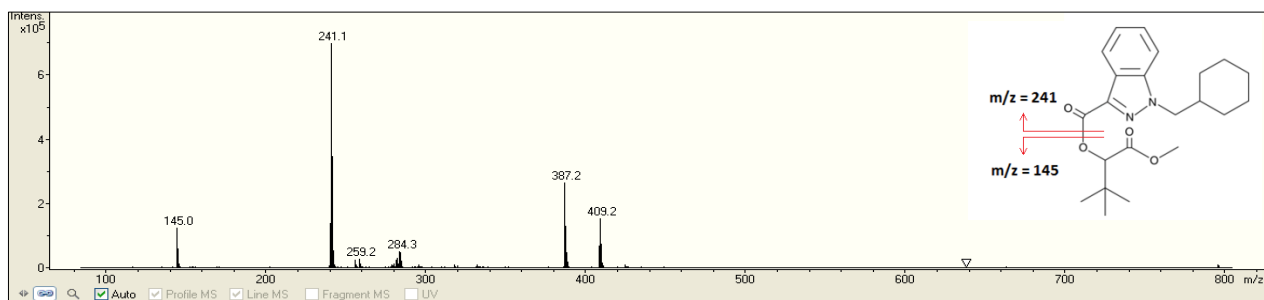


Figura 4: Spettro di massa di ESI⁺ di MO-CHMINACA, ottenuto aumentando la tensione al capillary exit a 151,7 V. L'eccesso di energia determina la frammentazione della molecola in corrispondenza del legame estereo.

7.2) Validazione

In accordo con le linee guida del Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI), sono stati investigati i seguenti parametri: selettività, effetto matrice, linearità, LOD, LOQ, carry over.

7.2.1) Selettività

La selettività è la capacità del metodo analitico di accertare inequivocabilmente l'identità dell'analita in presenza di altri componenti, come quelli della matrice, metaboliti, altri xenobiotici, impurità, etc. Questo parametro indica, dunque, l'affidabilità del dato analitico. Durante lo sviluppo di un metodo analitico-strumentale, la scelta della modalità di pretrattamento della matrice biologica, così come la scelta della fase stazionaria più adeguata, delle fasi mobili e del gradiente, nonché il processo di calibrazione strumentale, influenzano notevolmente la selettività del metodo, intesa, nel caso specifico di una strumentazione HPLC-ESI-TOF, come la capacità strumentale di misurazione della massa esatta dell'analita.

Come dimostrato in Tabella 1, la procedura analitico-strumentale HPLC-ESI-TOF messa in atto non risulta influenzata da interferenze endogene/esogene che possano determinare la generazione di falsi positivi/falsi negativi.

7.2.2) Effetto matrice

Durante la ionizzazione nell'interfaccia ESI, la competizione tra l'analita e certe componenti della matrice, coeluenti con l'analita d'interesse, ne riducono la capacità di raggiungere la fase gassosa. Questa competizione è

responsabile dell'effetto matrice, che si traduce in una soppressione/innalzamento del segnale ionico con conseguente inaffidabilità del dato analitico ottenuto.

Il metodo analitico-strumentale sviluppato non è influenzato dall'effetto matrice, dal momento che gli analiti presentavano un valore MF di $1 \pm 0,6$. Ciò è supportato dal fatto che, cromatograficamente, nessun interferente endogeno eluisce allo stesso tempo di ritenzione degli analiti di interesse.

7.2.3) Sensibilità del metodo: limite di rilevabilità e di quantificazione (LOD e LOQ)

Il limite di rilevabilità di una procedura analitica indica la quantità minima di analita nel campione in grado di confermare qualitativamente, e non necessariamente quantitativamente, la presenza o l'assenza di un analita; diversamente, la quantità minima di campione in grado di determinare un'analisi quantitativa è stabilita dal limite di quantificazione.

La sensibilità strumentale di rilevazione degli ioni protonati in fase gassosa è stata ottimizzata durante il processo di ionizzazione molecolare nella sorgente ionica, fornendo al campione un eccesso di ioni H^+ mediante l'aggiunta di 20 μ l di acido formico 0,1 %, processo che permette di acidificare il fluido orale favorendo la protonazione molecolare.

Il metodo analitico strumentale si è rivelato lineare e sensibile per tutti i cannabinoidi sintetici: i valori LOD calcolati sono compresi tra 5-10 ng/ml; i valori LOQ calcolati sono compresi tra 20-30 ng/ml.

7.2.4) Carry over

La valutazione del fenomeno di trascinamento degli analiti, carry over, è di fondamentale importanza al fine di garantire l'assenza di risultati falsi

positivi. La risposta strumentale di ciascun analita a concentrazioni crescenti si è rivelata lineare ($R^2 > 0,996$) e priva di effetto carry over.

7.3) Stabilità dei cannabinoidi sintetici nel fluido orale in seguito a catena di custodia t_{10} RT, t_{10} 4°C, t_{10} -20°C

La caratterizzazione strutturale delle molecole oggetto di indagine ne evidenzia il loro comportamento lipofilico, proprietà chimica che, dal punto di vista biologico, influenza solubilità, assorbimento, passaggio attraverso le membrane, legame con le proteine plasmatiche, penetrazione nel sistema nervoso centrale, distribuzione e accumulo nei tessuti/organi ed, infine, escrezione. Una catena di custodia che non tenga conto dell'importanza della lipofilicità è in grado di inficiare, dal punto di vista analitico-strumentale, tutti gli step procedurali fino all'attendibilità del dato da utilizzare in ambito clinico e/o forense.

Il risultato analitico relativo alla stabilità dei cannabinoidi sintetici esaminati nei campioni di fluido orale, nelle condizioni sopra descritte, sono esposti in Tabella 2, che riporta i valori percentuali (%) corrispondenti al recupero e al decadimento di ciascuna molecola d'interesse esaminata.

Nel campione di fluido orale mantenuto dieci giorni a temperatura ambiente (t_{10} RT) tutti gli analiti mostrano un considerevole decadimento nell'arco di tempo considerato, visti i recuperi mai superiori al 50%. In particolare, i cannabinoidi CB-13, JWH-147 e JWH-203 risentono maggiormente delle condizioni della catena di custodia impiegate in quanto, dopo 10 giorni, fino a 70 % della molecola decade quando il campione salivare è conservato a temperatura ambiente. Diversamente, non sono state apprezzate significative variazioni tra i campioni conservati a 4°C e quelli conservati a -20°C, all'interno del range di tempo considerato.

Analita	t₁₀ RT recupero %	Decadimento %	t₁₀ 4°C recupero %	Decadimento %	t₁₀ -20°C recupero %	Decadimento %
JWH-147	28,76	71,24	84,01	15,99	85,40	14,60
JWH-203	29,69	70,31	91,67	8,33	90,97	9,03
JWH-081	44,16	55,84	100,00	0,00	100,00	0,00
AM2233	38,38	61,62	85,27	14,73	81,46	18,54
CB-13	25,87	74,13	78,99	21,01	86,42	13,58
MO-CHMINACA	43,28	56,72	95,18	4,82	97,07	2,93

Tabella 2: Recupero (%) e decadimento (%) dei cannabinoidi sintetici nel fluido orale sottoposto a tre diverse catene di custodia (RT, 4°C, -20°C) dopo 10 giorni, all'interno di provette in polipropilene.

In Figura 5, è evidenziata graficamente la variazione del recupero degli analiti d'interesse (%) nel fluido orale sottoposto alle tre diverse condizioni di catena di custodia in funzione del tempo.

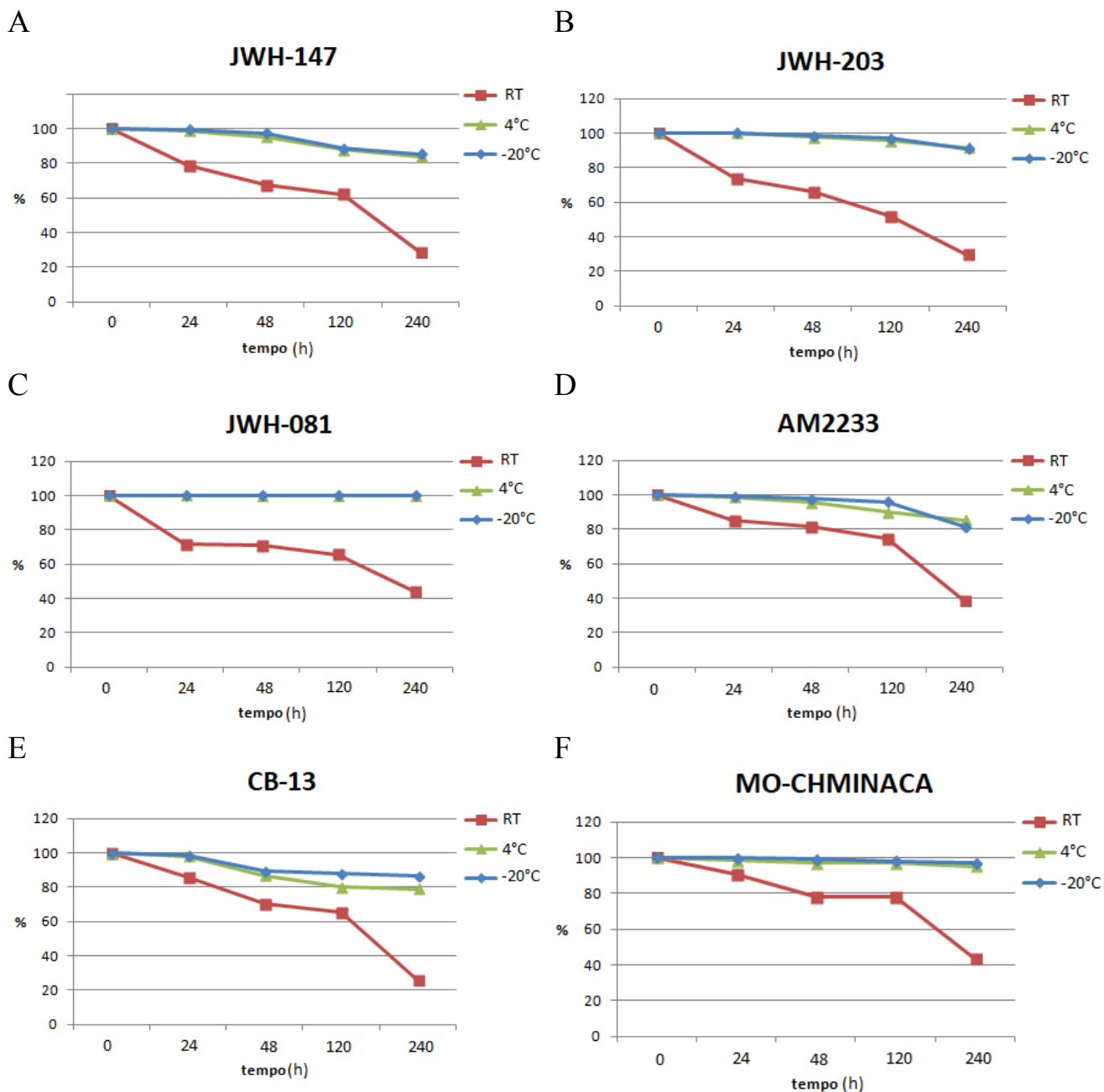


Figura 5: Rappresentazione grafica della variazione di recupero (%) dei cannabinoidi sintetici nel fluido orale ai diversi intervalli di tempo e nelle diverse condizioni di temperatura applicate.

7.3.1) Studi computazionali di stabilità dei cannabinoidi sintetici

I risultati analitico-strumentali ottenuti, che attestano il decadimento subito dai cannabinoidi sintetici presenti in un campione biologico mantenuto a

catena di custodia RT_{t10} , sono stati implementati utilizzando una funzione matematica fornita dal software *QSAR Toolbox*, programma che consente di simulare la trasformazione biotica (enzimatica) e abiotica (non enzimatica).

Vista la numerosità dei metaboliti generati mediante simulazione, il pathway metabolico microbico dei cannabinoidi sintetici sottoposti ad indagine è stato schematizzato in Figura 6 A-F. Le modificazioni chimico-strutturali del metabolismo dei cannabinoidi sintetici esaminati sono le reazioni di ossidazione molecolare, processo che avviene in ambiente aerobio, che porta in primo luogo alla formazione di metaboliti idrossilati e/o carbossilati, anche se altri processi sono frequenti, come le reazioni di dealchilazione o apertura di anelli aromatici ed eterociclici.

Per quanto riguarda le simulazioni dei processi di autossidazione/idrolisi, ottenute per via non enzimatica, tra le molecole testate, i composti JWH-203, JWH-081 e CB-13 sono risultati i più stabili e nessuna reazione di autossidazione o idrolisi si è realizzata a livello molecolare. I composti JWH-147 e AM2233 sono risultati suscettibili a livello del gruppo aromatico eterociclico pirrolo e dell'anello piperidinico rispettivamente, ma in nessuno dei due è stata prevista alcuna reazione di idrolisi. Data la particolare struttura del composto MO-CHMINACA, dalla simulazione di trasformazione abiotica è stata prevista, oltre che una reazione di autossidazione in corrispondenza del cicloesano, la formazione di prodotti di idrolisi, generati per scissione in corrispondenza dei due legami esterei presenti nella molecola.

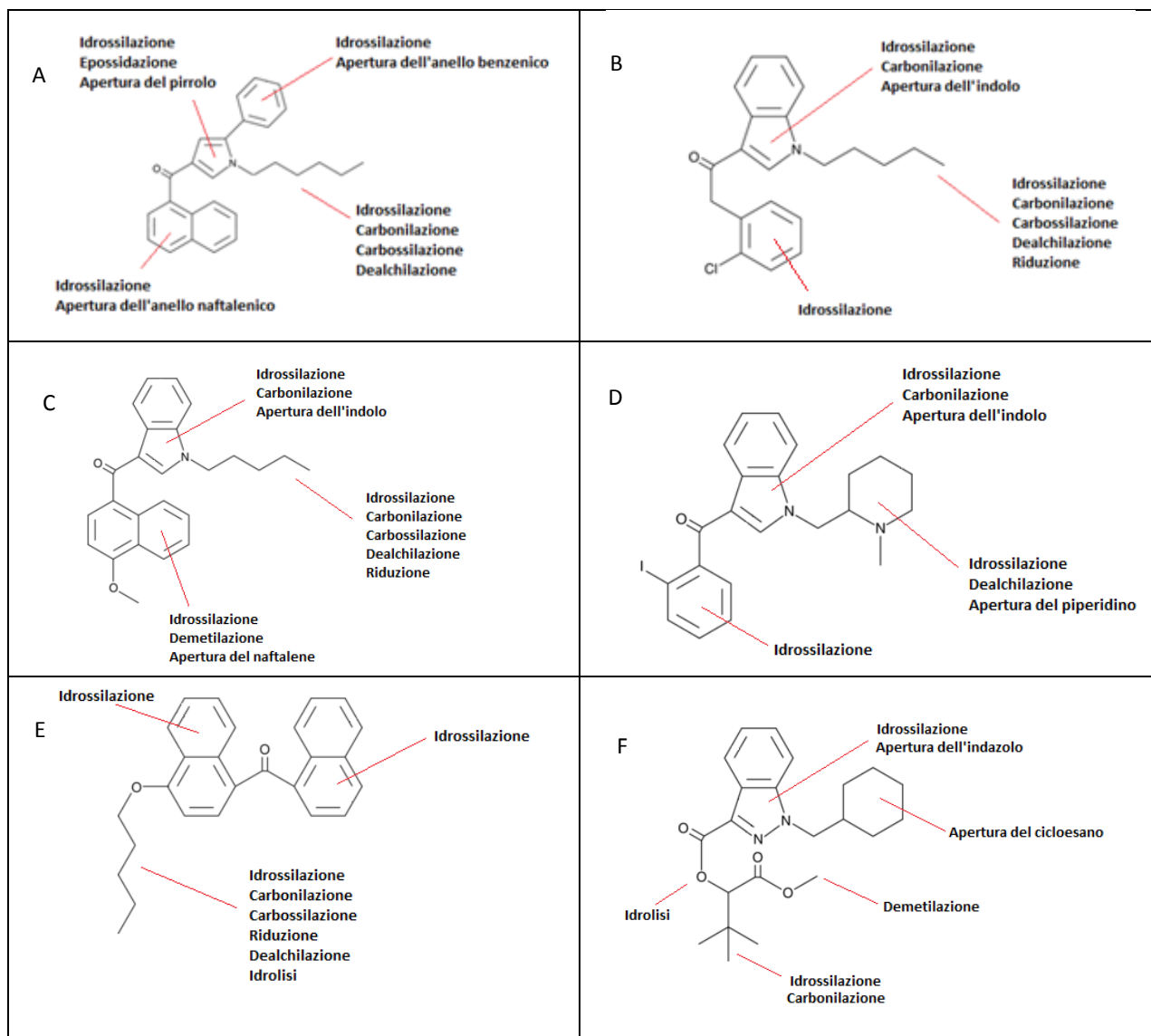


Figura 6: Schematizzazione del pathway metabolico simulato con il software QSAR Toolbox dei cannabinoidi sintetici sottoposti ad indagine.

Le proiezioni strutturali dei metaboliti dei cannabinoidi sintetici ottenuti in silico ha consentito la generazione delle masse esatte protonate mediante *IsotopePattern*, consentendo di verificare in HPLC-ESI-TOF la presenza/assenza di molecole originate da un ipotetico metabolismo microbico o da altri fattori.

Dopo l'acquisizione, gli spettri full scan MS, registrati nel range di massa m/z 100-800, sono stati elaborati estraendo ciascuno ione corrispondente ai prodotti di trasformazione dei cannabinoidi sintetici (Extracted Ion

Chomatogram, XIC). Dall'attenta analisi del profilo ionico dei cromatogrammi dei campioni, in cui è stato registrato il maggiore decadimento dei cannabinoidi sintetici (fluido orale t_{10} RT), non sono emersi ioni molecolari il cui valore di massa esatta sia riconducibile a un processo di trasformazione biotico/abiotico.

7.3.2 Stabilità delle molecole: ruolo del contenitore di raccolta

La pratica comune riguardo la raccolta dei campioni biologici per le successive analisi tossicologiche prevede il prelievo della matrice in appositi contenitori di plastica monouso. È stata presa in considerazione la natura chimica del materiale di raccolta del campione biologico ed una sua eventuale implicazione nella perdita degli analiti.

La sperimentazione di simulazione di combustione con la macchina del fumo è stata ripetuta, e, al termine della stessa, la saliva è stata conservata per dieci giorni a temperatura ambiente in un contenitore di vetro, anziché all'interno di provette di polipropilene, come nei casi precedenti.

I dati ottenuti sono schematizzati in Tabella 3, ove sono posti a confronto con quelli ottenuti precedentemente nel campione di fluido orale t_{10} RT conservato in provette in polipropilene (mostrati in Tabella 2).

Analita	t_{10} RT recupero % POLIPROPILENE	Decadimento %	t_{10} RT recupero % VETRO	Decadimento %
JWH-147	28,76	71,24	63,73	36,27
JWH-203	29,69	70,31	74,78	25,22
JWH-081	44,16	55,84	66,18	33,82
AM2233	38,38	61,62	50,81	49,19
CB-13	25,87	74,13	61,49	38,51
MO-CHMINACA	43,28	56,72	65,73	34,27

Tabella 3: Recupero (%) e decadimento (%) dei cannabinoidi sintetici nel fluido orale conservato per 10 giorni all'interno di un contenitore in vetro. Confronto con i dati precedenti, ottenuti conservando il fluido orale per 10 giorni all'interno di un contenitore in polipropilene.

Come evidenziato, si registra un recupero maggiore di tutti i cannabinoidi sintetici (%) nei contenitori di vetro piuttosto che in quelli in polipropilene, quando la matrice è lasciata a temperatura ambiente fino a dieci giorni. Per i cannabinoidi sintetici JWH-147, JWH-203 e CB-13, per cui si era evidenziato un decadimento (%) di circa il 70% nelle provette di polipropilene, sono stati determinati, dei recuperi corrispondenti a circa il doppio rispetto alla sperimentazione precedente se la matrice è conservata in materiale di vetro.

Ciò dimostra che la natura chimica del materiale di raccolta e conservazione del campione biologico influisce notevolmente sulla stabilità degli analiti. Nel caso specifico dei cannabinoidi sintetici è ipotizzabile che la loro natura altamente lipofila ne favorisce l'adsorbimento a livello della superficie del materiale plastico mediante interazioni idrofobiche. Di conseguenza, risulta indispensabile conoscere la labilità degli analiti di interesse clinico e forense, al fine di adottare tutti gli accorgimenti che impediscano qualunque tipo di alterazione a livello molecolare.

CONCLUSIONI

Conclusioni

I cannabinoidi sintetici, meglio conosciuti con i nomi “*Spice*”, “*K2*”, “*Cloud 9*”, “*Mojo*”, sono una problematica sociale a causa della loro imprevedibile tossicità e potenzialità d’abuso. Il rapido afflusso delle sostanze psicoattive di nuova generazione, che negli ultimi anni sta interessando l’Europa, rende molto più ampio e diversificato il numero delle molecole ad attività psicotropa attualmente ricercate per scopi clinici/forensi.

Le sostanze d’abuso mostrano, sotto il profilo strutturale, diverse proprietà chimico-fisiche, e di conseguenza una diversa suscettibilità ad agenti fisici/chimici/biologici, alle stesse condizioni di conservazione, per cui la possibilità di un decadimento della concentrazione analitica nelle matrici biologiche deve essere considerata. Lo studio di stabilità strutturale delle sostanze d’abuso di nuova generazione è piuttosto limitato su matrici alternative a sangue e urine, quali il fluido orale. La non invasività di raccolta e la capacità di poter stabilire un consumo recente di sostanze illecite, rendono questa matrice particolarmente interessante per la valutazione dello stato di intossicazione di soggetti alla guida di veicoli (*Driving Under Influence of Drugs, DUID*), ed in particolare sotto gli effetti delle (Nuove) Sostanze Psicoattive (NPS).

Dai risultati ottenuti nel presente lavoro si evince che, non solo la temperatura gioca un ruolo cruciale nella stabilità dei cannabinoidi sintetici nel fluido orale, ma è da considerare, nel caso di analiti con struttura chimica altamente lipofila, il fenomeno di adsorbimento delle molecole alla superficie del materiale plastico mediante interazioni idrofobiche. Questo adsorbimento avviene se i campioni biologici sono lasciati a temperatura ambiente all’interno di contenitori in polipropilene. In queste

condizioni, già dopo 24 h si osserva un decadimento sostanziale nella concentrazione degli analiti. Non è da escludere, tuttavia, la possibilità che si inneschino a temperatura ambiente dei processi biotici (metabolici) o abiotici in grado di alterare chimicamente gli analiti d'interesse, dal momento che anche nei campioni preservati nel vetro, seppur in minima percentuale, si è evidenziato un decadimento analitico. Diversamente accade se la matrice biologica è conservata ad una catena di custodia di 4°C e -20°C, condizioni che garantiscono un efficiente recupero dei cannabinoidi sintetici fino a 10 giorni, visti i recuperi superiori all'80 %. Comunque, sebbene si siano presi in considerazione cannabinoidi sintetici appartenenti a sei diverse tipologie strutturali, non sono state apprezzate significative differenze tra gli uni e gli altri in termini di recupero e decadimento (%) nelle medesime condizioni. Ciò può essere spiegato dai valori molto simili di LogP delle molecole in esame, valore che esprime la lipofilia delle molecole, e che, nel caso specifico dei cannabinoidi sintetici presi in considerazione, è compreso tra 5.5-7.5.

L'elevata dinamicità che caratterizza il mondo delle NPS, ed in particolare dei cannabinoidi sintetici, rende necessari continui studi in tema di sviluppo e validazione di metodi analitici-strumentali, tra cui la stabilità nelle matrici biologiche. I laboratori di tossicologia forense dovranno necessariamente fronteggiare questo fenomeno per rispondere ai quesiti posti in ambito sanitario e giuridico.

Prospettive future

Lo studio di stabilità strutturale delle molecole risulta fondamentale al fine ottimizzare tutti gli step del processo analitico, a partire dalla catena di custodia del campione fino all'ottenimento del dato d'interesse clinico/forense. La diffusione di sostanze d'abuso di nuova generazione e l'aumento dell'interesse della comunità scientifica nella ricerca di matrici alternative a sangue e urina, quali il fluido orale, richiede ulteriori indagini di stabilità molecolare finalizzate all'ottenimento di un dato analitico affidabile, vero e ripetibile, in grado di rispondere ai quesiti sorti in ambito clinico e/o medico legale.

In particolare, la recente comparsa nel mercato illecito di cannabinoidi sintetici con struttura basata sul gruppo indazolo 3-carbossilato (Figura 1f), di cui ne rappresenta un esempio il composto MO-CHMINACA, attualmente non incluso tra le sostanze d'abuso sottoposte a controllo, deve necessariamente essere accompagnata da ulteriori studi tossicologici, quali:

- l'aggiornamento in tema di standard di riferimento per lo sviluppo di metodiche analitico-strumentali e l'aggiornamento delle librerie di spettri di massa ESI-TOF, e, con la consapevolezza che molecole simili possano manifestare il medesimo fenomeno di adduzione cationica, lo studio di metodi per controllare tale fenomeno;
- lo studio della suscettibilità enzimatica di queste molecole in corrispondenza dell'estere carbossilato in campioni ematici, ove, la presenza di esterasi potrebbe determinare fenomeni idrolitici, rendendo difficoltosa l'interpretazione del dato analitico.

Il profilo tossicologico e metabolico di numerose NPS, tra cui i cannabinoidi sintetici, rimane, per molti aspetti, sconosciuto. È nota l'esistenza di una certa variabilità farmacocinetica sotto il profilo

stereospecifico per numerose molecole ad uso terapeutico, che ne influenza non solo l'efficacia terapeutica ma anche la comparsa di eventuali effetti indesiderati e/o tossici. Anche i cannabinoidi sintetici sono molecole chirali, e il loro comportamento sotto il profilo biologico è stereoselettivo. Di conseguenza, risultano fondamentali studi del profilo farmacocinetico/tossicologico stereospecifico di queste molecole di nuova generazione, che permettano di stabilire la correlazione tra lo stato di intossicazione in atto e quadro clinico manifestato dal soggetto.

Bibliografia

- [1] Gaoni Y., Mechoulam R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86 (8), 1646-1647.
- [2] Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. (2016). *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*. 7, 19.
- [3] Elsohly MA, Slade D. (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Science*. 78(5), 539-48.
- [4] Niesink RJM, van Laar MW. (2013). Does Cannabidiol Protect Against Adverse Psychological Effects of THC? *Frontiers in Psychiatry*. 4, 130.
- [5] Mechoulam R, Lander N, Varkony TH, Kimmel I, Becker O, Ben-Zvi Z, Edery H, Porath G. (1980). Stereochemical requirements for cannabinoid activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 23(10), 1068-72.
- [6] Mechoulam R, Feigenbaum JJ, Lander N, Segal M, Järbe TU, Hiltunen AJ, Consroe P. (1988). Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic activity. *Experientia*. 44(9), 762-4.
- [7] Devane WA., Dysarz FA. 3rd, Johnson MR., Melvin LS., Howlett AC. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*. 34, 605-613.
- [8] Matsuda LA., Lolait SJ., Brownstein MJ., Young AC., Bonner TI. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564.
- [9] Munro S., Thomas KL., Abu-Shaar M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65.

- [10] Begg M., Pacher P., Bátkai S., Osei-Hyiaman D., Offertáler L., Mo FM., Liu J., Kunos G. (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacology & Therapeutics*. 106(2), 133-45.
- [11] Hanus L., Abu-Lafi S., Fride E., Breuer A., Vogel Z., Shalev DE., et al. (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98, 3662-3665.
- [12] Devane WA., Hanus L., Breuer A., Pertwee RG., Stevenson LA., Griffin G., et al. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258, 1946-1949.
- [13] Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski NE., Schatz AR., et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*. 50, 83-90.
- [14] Baker D., Pryce G., Giovannoni G., Thompson AJ. (2003). The therapeutic potential of cannabis. *The Lancet Neurology*. 2(5), 291-8.
- [15] Alexander A., Smith PF., Rosengren RJ. (2009). Cannabinoids in the treatment of cancer. *Cancer Letters* Volume 285(1), 6-12.
- [16] Smith LA., Azariah F., Lavender VT., Stoner NS., Bettiol S. (2015). Cannabinoids for nausea and vomiting in adults with cancer receiving chemotherapy. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 12;(11):CD009464.
- [17] Belendiuk KA., Baldini LL., Bonn-Miller MO. (2015). Narrative review of the safety and efficacy of marijuana for the treatment of commonly state-approved medical and psychiatric disorders. *Addiction Science & Clinical Practice*. 10:10.
- [18] Thakur GA., Duclos RI. Jr., Makriyannis A. (2005). Natural cannabinoids: Templates for drug discovery. *Life Sciences*. 78, 454-466

- [19] Razdan RK. (1986). Structure-activity relationships in cannabinoids. *Pharmacological Review*. 38(2), 75-149.
- [20] Makriyannis A, Rapakaab RS. (1990). The molecular basis of cannabinoid activity. *Life Sciences Volume* 47(24), 2173-2184.
- [21] Seltzman HH. (1999). Structure and receptor activity for classical cannabinoids. *Current Medicinal Chemistry*. 6(8), 685-704.
- [22] Adams R., Harfenist M., Loewe S. (1949). New Analogs of Tetrahydrocannabinol. XIX. *Journal of the American Chemical Society*. 71 (5), 1624-1628.
- [23] Huffman JW., Miller JRA., Liddle J., Yu S., Thomas BF., Wiley JL., Martin BR. (2003) Structure–activity relationships for 1',1'-dimethylalkyl- Δ^8 -tetrahydrocannabinols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 11(7), 1397-1410.
- [24] Keimowitz AR., Martin BR., Razdan RK., Crocker PJ., Mascarella SW., Thomas BF. (2000). QSAR analysis of Delta(8)-THC analogues: relationship of side-chain conformation to cannabinoid receptor affinity and pharmacological potency. *Journal of Medicinal Chemistry* 43:59-70.
- [25] Adam J., Cowley PM., Kiyoi T., Morrison AJ., Mort CJW. (2006). Recent progress in cannabinoids research. *Progress in Medicinal Chemistry*. 44, 207-329.
- [26] Ottani A., Giuliani D. (2001). HU 210: A Potent Tool for Investigations of the Cannabinoid System. *CNS Drug Reviews*. 7(2), 131-45.
- [27] Ramírez E. A., Blázquez C., Gómez Del Pulgar T., Guzmán M., De Ceballos M. L. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *Journal of Neuroscience*. 25 (8), 1904-1913.

[28] Johnson, M.R., Melvin, L.S. (1986). The discovery of nonclassical cannabinoids analgetics. In "Cannabinoids as therapeutic agents" (R.Mechoulam, ed), pp.121-144, CRC Press, Boca Raton, Florida.

[29] Melvin LS., Johnson MR., Harbert CA., Milne GM., Weissman A. (1984). A cannabinoid derived prototypical analgesic. *Journal of Medicinal Chemistry*. 27(1), 67-71.

[30] Melvin LS., Milne GM., Johnson MR., Subramaniam B., Wilken GH., Howlett AC. (1993). Structure-activity relationships for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs. *Molecular Pharmacology*. 44(5), 1008-15.

[31] Xie XQ., Melvin LS., Makriyannis A. (1996). The Conformational Properties of the Highly Selective Cannabinoid Receptor Ligand CP-55,940. *Journal of Biological Chemistry*. 271(18), 10640-7.

[32] D'Ambra TE., Estep KG., Bell MR., Eissenstat MA., Josef KA., Ward SJ., Haycock DA., Baizman ER., Casiano FM. (1992). Conformationally restrained analogs of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 35 (1), 124-135.

[33] Huffman JW., Dai D., Martin BR., Compton DR. (1994). Design, synthesis and pharmacology of cannabimimetic indoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 4, 563-6.

[34] Showalter VM., Compton DR., Martin BR., Abood ME. (1996). Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 278(3), 989-99.

[35] Thomas BF., Compton DR., Martin BR., Semus SF. (1991). Modeling the cannabinoid receptor: a three-dimensional quantitative structure-activity analysis. *Molecular Pharmacology*. 40, 656-65.

- [36] Martin BR., Compton DR., Thomas BF., Prescott WR., Little PJ., Razdan RK., Johnson MR., Melvin LS., Mechoulam R., Ward SJ. (1991). Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol Biochem Behav.* 40, 471-8.
- [37] Wiley JL., Compton DR., Dai D., Lainton JA., Phillips M., Huffman JW., Martin BR. (1998). Structure-activity relationships of indole- and pyrrole-derived cannabinoids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 285(3), 995-1004.
- [38] Wiley JL., Marusich JA., Huffman JW. (2014). Moving around the molecule: Relationship between chemical structure and in vivo activity of synthetic cannabinoids. *Life Science.* 97(1), 55-63.
- [39] Compton DR., Rice KC., De Costa BR., Razdan RK., Melvin LS., Johnson MR., Martin BR. (1993). Cannabinoid structure-activity relationships: Correlation of receptor binding and in vivo activities. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 265, 218-26.
- [40] Banister SD. Stuart J., Kevin RC., Edington A., Longworth M., Wilkinson SM., Beinat C., Buchanan AS., Hibbs DE., Glass M., Connor M., McGregor IS., Kassiou M. (2015). The effects of bioisosteric fluorine in synthetic cannabinoid designer drugs JWH-018, AM-2201, UR-144, XLR-11, PB-22, 5F-PB-22, APICA, and STS-135. *ACS Chemical Neuroscience.* 6(8), 1445-58.
- [41] Cox AO., Daw RC., Mason MD., Grabenauer M., Pande PG., Davis KH., Wiley JL., Stout PR., Thomas BF., Huffman JW. (2012). Use of SPME-HS-GC-MS for the analysis of herbal products containing synthetic cannabinoids. *Journal of Analytical Toxicology.* 36, 293-302.
- [42] Auwärter V., Dresen S., Weinmann W., Müller M., Pütz M., Ferreirós N. (2009). "Spice" and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? *Journal of Mass Spectrometry.* 44, 832-837.

- [43] Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Kawahara N., Goda, Y. (2009a). Identification of a cannabimimetic indole as a designer drug in a herbal product. *Forensic Toxicology*. 27, 61-66.
- [44] Lindigkeit R., Boehme A., Eiserloh I., Luebbecke M., Wiggermann M., Ernst L., Beuerle, T. (2009). Spice: a never ending story? *Forensic Science International*. 191, 58-63.
- [45] Dresen S., Ferreirós N., Pütz M., Westphal F., Zimmermann R., Auwärter V. (2010). Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds. *Journal of Mass Spectrometry*. 45, 1095-1232.
- [46] Westphal F., Sönnichsen F. D., Thiemt S. (2011). Identification of 1-butyl-3-(1-(4-methyl)naphthoyl)indole in a herbal mixture. *Forensic Science International*. 215(1-3), 8-13.
- [47] Hudson S., Ramsey J. (2011). The emergence and analysis of synthetic cannabinoids. *Drug Testing and Analysis*. 3, 466-478.
- [48] Ernst L., Schiebel H.M., Theuring C., Lindigkeit R., Beuerle T. (2011). Identification and characterization of JWH-122 used as new ingredient in “spice-like” herbal incenses. *Forensic Science International*. 208, 31-35.
- [49] European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2017). Disponibile a <http://www.emcdda.europa.eu/topics/pods/synthetic-cannabinoids>
- [50] Orsolini L., Papanti D., Corkery J., Schifano F. (2017). An insight into the deep web; why it matters for addiction psychiatry? *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*. 32(3).
- [51] Deluca P., Davey Z., Corazza O., Di Furia L., Farre M., Flesland LH., Mannonen M., Majava A., Peltoniemi T., Pasinetti M., Pezolesi C., Scherbaum N., Siemann H., Skutle A., Torrens M., van der Kreeft P., Iversen E., Schifano F. (2012). Identifying emerging trends in recreational drug use; outcomes from the Psychonaut

Web Mapping Project. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 39, 221-226.

[52] Castaneto MS, Gorelick DA, Desrosiers NA, Hartman RL, Pirard S, Huestis MA. (2014). Synthetic cannabinoids: epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug Alcohol Dependence* 144, 12-41.

[53] Castellanos D, Singh S, Thornton G, Avila M, Moreno A. (2011). Synthetic cannabinoid use: a case series of adolescents. *Journal of Adolescent Health*. 49, 347-349.

[54] Bozkurt M, Umut G, Evren C, Karabulut V. (2014). Clinical Characteristics and Laboratory Test Results of Patients Admitted to Outpatient Clinic for Synthetic Cannabinoid Usage. *Journal of Psychology and Neuroscience*; 27, 328-334.

[55] Giroud C., de Cesare M., Berthet A., Varlet V., Concha-Lozano N., Favrat B. (2015). E-Cigarettes: A Review of New Trends in Cannabis Use. *International Journal of Environmental Research and Public Health* (2015), 12(8), 9988-10008.

[56] Pertwee RG. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology & Therapeutics*. 74, 129-80.

[57] Tai S., Fantegrossi W.E. Pharmacological and Toxicological effects of Synthetic Cannabinoids and their metabolites. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (2017), 32, 249-262.

[58] Atwood BK., Huffman JW., Straiker A., Mackie K. (2010). JWH-018, a common constituent of 'Spice' herbal blends, is a potent and efficacious cannabinoid CB receptor agonist. *British Journal of Pharmacology*. 160, 585-593.

[59] Fattore L., Fratta W. (2011). Beyond THC: The New Generation of Cannabinoid Designer Drugs. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 5, 60.

- [60] Baumann MH., Solis E., Watterson LR., Marusich JA., Fantegrossi WE., Wiley JL. (2014). Baths salts, spice, and related designer drugs: the science behind the headlines. *Journal of Neuroscience*. 34, 15150-15158.
- [61] Hermanns-Clausen M., Kneisel S., Hutter M., Szabo B., Auwärter V. (2013). Acute intoxication by synthetic cannabinoids-four case reports. *Drug Test Anal*. 5, 790-794.
- [62] Hermanns-Clausen M., Kneisel S., Szabo B., Auwärter V. (2013). Acute toxicity due to the confirmed consumption of synthetic cannabinoids: clinical and laboratory findings. *Addiction*. 108, 534-544.
- [63] Bozkurt M., Umut G., Evren C., Karabulut V. (2014). Clinical Characteristics and Laboratory Test Results of Patients Admitted to Outpatient Clinic for Synthetic Cannabinoid Usage. *Journal of Psychology and Neuroscience*. 27, 328-334.
- [64] Cohen J., Morrison S., Greenberg J., Saidinejad M. (2012). Clinical presentation of intoxication due to synthetic cannabinoids. *Pediatrics* 129(4).
- [65] Harris CR., Brown A. (2013). Synthetic cannabinoid intoxication: a case series and review. *Journal of Emergency Medicine*. 44, 360-366.
- [66] Heath T., Burroughs Z., Thompson J., Tecklenburg F. (2012). Acute intoxication caused by a synthetic cannabinoid in two adolescents. *J Pediatric Pharmacology Therapeutics* 17(2), 177-181.
- [67] Schneir AB., Cullen J., Ly BT. (2011). "Spice" girls: Synthetic cannabinoid intoxication. *Journal of Emergency Medicine* 40, 296.
- [68] Simmons JR., Skinner CG., Williams J., Kang CS., Schwartz MD., Wills BK. (2011). Intoxication from smoking "spice". *Annals of Emergency Medicine*. 57, 187-188.

- [69] Faircloth J., Khandheria B., Shum S. (2012). Case report: adverse reaction to synthetic marijuana. *American Journal on Addiction*. 21: 289-290.
- [70] Lapoint J., James L., Moran C., Nelson L., Hoffman R., Moran J. (2011). Severe toxicity following synthetic cannabinoid ingestion; *Clinical Toxicology*. 49(8). 760-4.
- [71] Saito T., Namera A., Miura N., Ohta S., Miyazaki S., Osawa M., Inokuchi S. (2013). A fatal case of MAM-2201 poisoning. *Forensic Toxicology*. 31(2), 333-337.
- [72] McKeever RG., Vearrier D., Jacobs D., LaSala G., Okaneku J., Greenberg MI. (2015). K2-not the spice of life; synthetic cannabinoids and ST elevation myocardial infarction: a case report. *Journal of Medical Toxicology* 11, 129-131.
- [73] Mir A., Obafemi A., Young A., Kane C. (2011). Myocardial infarction associated with use of the synthetic cannabinoid K2. *Pediatrics*. 128, 1622-1627.
- [74] Freeman MJ., Rose DZ., Myers MA., Gooch CL., Bozeman AC., Burgin WS. (2013). Ischemic stroke after use of the synthetic marijuana “spice”. *Neurology*. 81. 2090-2093.
- [75] Young AC., Schwarz E., Medina G., Obafemi A., Feng SY., Kane C., Kleinschmidt K. (2012). Cardiotoxicity associated with the synthetic cannabinoid, K9, with laboratory confirmation. *American Journal of Emergency Medicine*. 30, 1320.
- [76] Clark BC., Georgekutty J., Berul CI. (2015). Myocardial Ischemia Secondary to Synthetic Cannabinoid (K2) Use in Pediatric Patients. *Journal of Pediatrics*. 167, 757-761.
- [77] Zimmermann US., Winkelmann PR., Pilhatsch M., Nees JA., Spanagel R., Schulz K. (2009). Withdrawal phenomena and dependence syndrome after the consumption of “spice gold”. *Deutsches Ärzteblatt International*. 106, 464-467.
- [78] Hopkins CY, Gilchrist BL. (2013). A case of cannabinoids hyperemesis syndrome caused by synthetic cannabinoids. *Journal of Emergency Medicine*. 45, 544.

- [79] Kazory A., Aiyer R. (2013). Synthetic marijuana and acute kidney injury: an unforeseen association. *Clinical Kidney Journal*. 6, 330-333.
- [80] Thornton SL., Wood C., Friesen MW., Gerona RR. (2013). Synthetic cannabinoid use associated with acute kidney injury. *Clinical Toxicology (Phila)*. 51, 189-190.
- [81] Murphy TD., Weidenbach KN., Van Houten C., Gerona RR., Moran JH., Kirschner RI., Marraffa JM., Stork CM., Birkhead GS., Newman A., et al. (2013). Acute Kidney Injury Associated with Synthetic Cannabinoid Use - Multiple States, 2012; Centers for Disease Control and Prevention Report 62(6).
- [82] Loschner A., Cihla A., Jalali F., Ghamande S. (2011). Diffuse alveolar hemorrhage: Add “greenhouse effect” to the growing list. *Chest Journal*. 140(4), 149A.
- [83] Alhadi S., Tiwari A., Vohra R., Gerona R., Acharya J., Bilello K. (2013). High times, low sats: Diffuse pulmonary infiltrates associated with chronic synthetic cannabinoid use; *Journal of Medical Toxicology* 9(2), 199-206.
- [84] Musshoff F., Madea B., Kernbach-Wighton G., Bicker W., Kneisel S., Hutter M., Auwärter V. (2014). Driving under the influence of synthetic cannabinoids (“Spice”): a case series. *International Journal of Legal Medicine*. 128, 59-64.
- [85] Yeakel JK., Logan BK. (2013). Blood synthetic cannabinoids concentrations in cases of suspected impaired driving; *Journal of Analytical Toxicology*. 37(8), 547-51.
- [86] Schneir AB., Baumbacher T. (2012). Convulsions associated with the use of a synthetic cannabinoid product. *Journal of Medical Toxicology* 8(1), 62-4.
- [87] McQuade D., Hudson S., Dargan PI., Wood DM. (2013). First European case of convulsions related to analytically confirmed use of the synthetic cannabinoid receptor agonist AM-2201. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 69(3), 373-6.

- [88] Every-Palmer S. (2011). Synthetic cannabinoid JWH-018 and psychosis: An explorative study. *Drug Alcohol Dependence*. 117(2-3), 152-7.
- [89] Müller H., Sperling W., Köhrmann M., Huttner FB., Kornhuber J., Maler J. (2010). The synthetic cannabinoid Spice as a trigger for an acute exacerbation of cannabis induced recurrent psychotic episodes. *Schizophrenia Research*. 118(1-3), 309-10.
- [90] Hurst D., Loeffler G., McLay R. (2011). Psychosis associated with synthetic cannabinoid agonists: a case series. *Am J Psychiatry*. 168(10), 1119.
- [91] Van der Veer N., Friday J. (2011). Persistent psychosis following the use of Spice. *Schizophrenia Research*. 130, 285-286.
- [92] Durand D., Delgado LL., de la Parra-Pellot DM., Nichols-Vinueza D. (2015). Psychosis and severe rhabdomyolysis associated with synthetic cannabinoid use: A case report. *Clinical Schizophrenia & Related Psychoses*. 8, 205-208.
- [93] New drugs. Update e piano di azione nazionale per la prevenzione della diffusione delle Nuove sostanze Psicoattive (NSP) e dell'offerta in internet. (2013). A cura di: Serpelloni G., Sistema Nazionale di Allerta Precoce - Dipartimento Politiche Antidroga, Presidenza del Consiglio dei Ministri. <http://www.politicheantidroga.gov.it/it/attivita%20e-progetti/pubblicazioni/le-pubblicazioni/new-drugs-update-e-piano-di-azione-nazionale/new-drugs-update-e-piano-di-azione-nazionale/>
- [94] Callaghan RC., Gatley JM., Veldhuizen S., Lev-Ran S., Mann R., Asbridge M. (2013). Alcohol- or drug-use disorders and motor vehicle accident mortality: A retrospective cohort study. *Accident Analysis & Prevention*. 53, 149-155.
- [95] Elvik R. (2013). Risk of road accident associated with the use of drugs: A systematic review and meta-analysis of evidence from epidemiological studies. *Accident Analysis & Prevention*. 60, 254-267.

- [96] Chen H., Chen Q., Chen L., Zhang G. (2016). Analysis of risk factors affecting driver injury and crash injury with drivers under the influence of alcohol (DUI) and non-DUI. *Traffic Inj Prev.* 17(8), 796-802.
- [97] Caplan YH., Goldberger BA. (2001). Alternative specimens for workplace drug testing. *J Anal Toxicol.* 25(5), 396-9.
- [98] Lo Muzio L., Falaschini S., Rappelli G., Bambini F., Baldoni A., Procaccini M., Cingolani M. (2005). Saliva as a diagnostic matrix for drug abuse. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 18(3), 567-73.
- [99] Bosker WM., Huestis MA. (2009). Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clinical Chemistry.* 55(11), 1910-31.
- [100] Anizan S., Huestis MA. (2014). The potential role of oral fluid in antidoping testing. *Clinical Chemistry.* 60(2), 307-22.
- [101] Lee D., Huestis MA. (2014). Current knowledge on cannabinoids in oral fluid. *Drug Testing and Analysis.* 6(1-2), 88-111.
- [102] Schmidt A. (1875). Die Ausscheidung des Weingeisters durch die Respiration, *Zbl. Med. Wiss.* 13, 371–374.
- [103] Veitenheimer AM., Wagner JR. (2017). Evaluation of Oral Fluid as a Specimen for DUID. *Journal of Analytical Toxicology.* 41(6), 517-522.
- [104] Strano-Rossi S., Anzillotti L., Castrignanò E., Felli M., Serpelloni G., Mollica R., Chiarotti M. (2011). UHPLC-ESI-MS/MS method for direct analysis of drugs of abuse in oral fluid for DUID assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 401, 609-624.
- [105] Anzillotti L., Castrignanò E., Strano-Rossi S., Chiarotti M. (2014). Cannabinoids determination in oral fluid by SPME–GC/MS and UHPLC MS/MS and its application on suspected drivers. *Science and Justice.* 54, 421–426.

- [106] Busardò FP., Pichini S., Pellegrini M., Montana A., Faro AFL., Zaami S., Graziano S. (2017). Correlation between blood and oral fluid psychoactive drug concentrations and cognitive impairment in Driving Under the Influence of Drugs. *Current Neuropharmacology*. 15, 1-12.
- [107] Ellefsen KN., Concheiro M., Pirard S., Gorelick DA., Huestis MA. (2016). Cocaine and benzoylecgonine oral fluid on-site screening and confirmation. *Drug Testing and Analysis*. 8(3-4), 296-303.
- [108] Newmeyer MN., Desrosiers NA., Lee D., Mendu DR., Barnes AJ., Gorelick DA., Huestis MA. (2014). Cannabinoid disposition in oral fluid after controlled cannabis smoking in frequent and occasional smokers. *Drug Testing and Analysis*. 6(10), 1002-10.
- [109] Wille SMR., Eliaerts J., Di Fazio V., Samyn N. (2017). Challenges concerning new psychoactive substance detection in oral fluid. *Toxicologie Analytique & Clinique*. 29, 11-17.
- [110] Strano-Rossi S., Anzillotti L., Castrignanò E., Romolo FS., Chiarotti M. (2012). Ultra high performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandemmass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, “spice” and stimulants in oral fluid. *Journal of Chromatography A*, 1258, 37-42.
- [111] Amaratunga P., Lemberg BL., Lemberg D. (2013). Quantitative Measurement of Synthetic Cathinones in Oral Fluid. *Journal of Analytical Toxicology*. 37, 622–628.
- [112] Coulter C., Garnier M., Moore C. (2011). Synthetic Cannabinoids in Oral Fluid. *Journal of Analytical Toxicology*. 35(7), 424-30.
- [113] Edgar WM. (1992). Saliva: its secretion, composition and functions. *British Dental Journal*. 172(8), 305-312.

- [114] Humphrey SP., Williamson RT. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 85(2), 162-169.
- [115] Proctor GB. (2016). The physiology of salivary secretion. *Periodontology 2000*. 70(1), 11-25.
- [116] Shaila M., Pai GP., Shetty P. (2013). Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: a comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 17(1), 42-46.
- [117] Fàbian TK., Hermann P., Beck A., Fejèrdy P., Fàbian G. (2012). Salivary Defense Proteins: Their network and role in innate and acquired oral immunity. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(4), 4295-4320.
- [118] Singh S, Ramesh V., Oza N., Balamurali PD., Prashad KV., Balakrishnan P. (2014). Evaluation of serum and salivary lipid profile: a correlative study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 18(1), 4-8.
- [119] Dawes C. (1987). Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *Journal of Dental Research*. 66, 648-53.
- [120] Choo RE., Huestis MA. (2004). Oral fluid as a diagnostic tool. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 42, 1273-87.
- [121] Drummer OH. (2006). Drug testing in oral fluid. *Clinical Biochemist Reviews*. 27(3), 147-159.
- [122] Cone E., Huestis M. (2007). Interpretation of Oral Fluid Tests for Drugs of Abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1098, 51-103.
- [123] Drummer OH. (2005). Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Science International*. 150(2-3), 133-142.

[124] Toennes SW., Steinmeyer S., Maurer HJ., Moeller MR., Kauert GF. (2005). Screening for Drugs of Abuse in Oral Fluid-Correlation of Analysis Results with Serum in Forensic Cases. *Journal of Analytical Toxicology*, 29(1), 22-7.

[125] Wille S., Raes E., Lillsunde P., Gunnar T., Laloup M., Samyn N., Christophersen A., Moeller M., Hammer K., Verstraete A. (2009). Relationship Between Oral Fluid and Blood Concentrations of Drugs of Abuse in Drivers Suspected of Driving Under the Influence of Drugs. *Therapeutic Drug Monitoring*. 31(4), 511-519.

[126] Gjerde H., Mordal J., Christophersen AS., Bramness JG., Mørland J. (2010). Comparison of drug concentrations in blood and oral fluid collected with the Intercept sampling device. *Journal of Analytical Toxicology*. 34(4), 204-9.

[127] Langel K., Gjerde H., Favretto D., Lillsunde P., Øiestad EL., Ferrara SD., Verstraete AG. (2014). Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. *Drug Testing Analysis*. 6(5), 461-71.

[128] Lee D., Vandrey R., Milman G., Bergamaschi M., Mendu DR., Murray JA., Barnes AJ., Huestis MA. (2013). Oral fluid/plasma cannabinoid ratios following controlled oral THC and smoked cannabis administration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405(23), 7269–7279.

[129] Desrosiers NA., Barnes AJ., Hartman RL., Scheidweiler KB., Kolbrich-Spargo EA., Gorelick DA., Goodwin RS., Huestis MA. (2013). Oral fluid and plasma 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and metabolite correlation after controlled oral MDMA administration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405, 4067-4076.

[130] Kneisel S., Auwarter V., Kempf J. (2013). Analysis of 30 synthetic cannabinoids in oral fluid using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Drug Testing Analysis*. 5(8), 657-669.

[131] Øiestad EL., Johansen U., Christophersen AS., Karinen R. (2013). Screening of synthetic cannabinoids in preserved oral fluid by UPLC–MS/MS. *Bioanalysis*. 5(18), 2257-2268.

[132] Rodrigues WC., Catbagan P., Rana S., Wang GH., Moore C. (2013). Detection of synthetic cannabinoids in oral fluid using ELISA and LC–MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 37(8), 526-533.

[133] De Castro A., Piñeiro B., Lendoiro E., Cruz A., López- Rivadulla M. (2013). Quantification of selected synthetic cannabinoids and δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1295 99-106.

[134] Kneisel S., Speck M., Moosmann B., Corneillie TM., Butlin NG., Auwärter V. (2013). LC/ESI–MS/MS method for quantification of 28 synthetic cannabinoids in neat oral fluid and its application to preliminary studies on their detection windows. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405(14), 4691-4706.

[135] Amaratunga P., Thomas C., Lemberg BL., Lemberg D. (2014). Quantitative measurement of XLR11 and UR-144 in oral fluid by LC–MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 38(6), 315-32.

[136] Kerrigan S. Sampling, storage and stability (2013). In: Gail Cooper, Adam Negrusz (Eds). *Clarke's Analytical Forensic Toxicology* Second edition, 335-356.

[137] Briscoe CJ., Hage DS. (2009). Factors affecting the stability of drugs and drug metabolites in biological matrices. *Bioanalysis*. 1(1), 205-220.

[138] Carbone M., Castelluccio F., Daniele A., Sutton A., Ligresti C., Di Marzo V., Gavagnina M. (2010). Chemical characterisation of oxidative degradation products of Δ^9 -THC. *Tetrahedron*. 66(49), 9497-9501.

[139] Brim RL., Noon KR., Collins GT., Nichols J., Narasimhan D., Sunahara RK., Woods JH. (2011). The Ability of Bacterial Cocaine Esterase to Hydrolyze Cocaine Metabolites and Their Simultaneous Quantification Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Molecular Pharmacology*. 80(6), 1119-1127.

- [140] Isenschmid DS., Levine BS., Caplan YH. (1989). A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites. *Journal of Analytical Toxicology*. 13(5), 250-6.
- [141] Fandiño AS., Karas M., Toennes SW., Kauert G. (2002). Identification of anhydroecgonine methyl ester N-oxide, a new metabolite of anhydroecgonine methyl ester, using electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 37(5), 525-32.
- [142] Martin BR., Bailey BB., Awaya H., May EL., Narasimhachari N. (1982). In vitro metabolism of 1-phenyl-1-cyclohexene, a pyrolysis product of phencyclidine. *Drug Metabolism & Disposition*. 10(6), 685-9.
- [143] Sato M., Hida M., Nagase H. (2004). Analysis of pyrolysis products of methamphetamine. *Journal of Analytical Toxicology*. 28(8), 638-43.
- [144] Tjeerdema RS. (1987). The pyrolysis of cannabinoids. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 99, 61-81.
- [145] Thomas BF., Lefever TW., Cortes RA., Grabenauer M., Kovach AL., Cox AO., Patel PR., Pollard GT., Marusich JA., Kevin RC., Gamage TF., Wiley JL. (2017). Thermolytic degradation of synthetic cannabinoids: chemical exposures and pharmacological consequences. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 361(1), 162-171.
- [146] Adamowics P., Zuba D., Sekula K. (2013). Analysis of UR-144 and its pyrolysis product in blood and their metabolites in urine. *Forensic Science International*. 233(1-3), 320-327.
- [147] Kaizaki-Mitsumoto A., Hataoka K., Funada M., Odanaka Y., Kumamoto H., Numazawa S. (2017). Pyrolysis of UR-144, a synthetic cannabinoid, augments an affinity to human CB1 receptor and cannabimimetic effect in mice. *Journal of Toxicological Sciences*. 42(3), 335-341.

[148] Banerjee S., Mazumdar S. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2012 ID 282574.

[149] Arora B., Velpandian T., Saxena R., Lalwani S., Dogra TD., Ghose S. (2016). Development and validation of an ESI-LC-MS/MS method for simultaneous identification and quantification of 24 analytes of forensic relevance in vitreous humor, whole blood and plasma. *Drug Testing Analysis*. 8(1), 86-97.

[150] Fenn JB., Mann M., Meng CK., Wong SF., Whitehouse CM. (1989). Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of large biomolecules. *Science*. 246(4926), 64-71.

[151] Boesl U. (2016). Time-of-flight mass spectrometry: Introduction to the basics. *Mass Spectrometry Review*. 36(1), 86-109.

[152] Matuszewski BK., Constanzer ML., Chavez-Eng CM. (2003). A Systematic approach to reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Analytical Chemistry*. 75, 3019-3030.

[153] Moir D., Rickert WS., Levasseur G., Larose Y., Maertens R., White P., Desjardins S. (2008). A Comparison of Mainstream and Sidestream Marijuana and Tobacco Cigarette Smoke Produced under Two Machine Smoking Conditions. *Chemical Research in Toxicology*. 21(2), 494-502.

Ringraziamenti

Non ci sono parole per descrivere la mia gratitudine.
Ho iniziato questo percorso con il sorriso sulle labbra e con lo stupore di un
bambino negli occhi, affascinata ogni giorno di più dal mondo della
Tossicologia in ogni sua sfumatura.
Oggi, a distanza di tre anni, posso dire di essere davvero felice di aver fatto
parte della squadra della Tossicologia, con voi ragazzi,
Roberto, Beatrice, Elena, Davide, Irene, Arianna.
E per questo ringrazio il Prof. Giorgetti che me ne ha dato l'opportunità.
Robby, maestro, amico mio, i miei binari, porterò i tuoi insegnamenti
sempre con me. A te il mio più grande
Grazie!