

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI SASSARI

Dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie Chimiche

Indirizzo Scienze Farmaceutiche

XXVI ciclo

Metodi di screening, conferma e separazione enantiomerica di nuovi designer drugs amfetamino-simili

Dott.ssa Lucia Burrai

Tutor

Chiar.mo Prof. Gianpiero Boatto

Anno accademico 2012-2013

INTRODUZIONE

I "designer drugs" possono essere definiti come "nuove sostanze d'abuso simili, per quel che riguarda l'azione, ad una molecola già conosciuta da tempo e create attuandone minime modificazioni strutturali" [**1**] o come "sostanze d'abuso con proprietà ed effetti simili a quelli di allucinogeni o narcotici, ma con una struttura molecolare leggermente alterata, nell'intento di aggirare la normativa riguardante gli stupefacenti" [**2**]. Entrambe queste definizioni sono corrette. In particolare la seconda spiega il motivo per il quale negli ultimi anni il mercato clandestino ha mostrato un crescente interesse nei confronti dei designer drugs: questi non possono essere considerati sostanze illecite fino al momento in cui i loro nomi non vengono ufficialmente inseriti nella suddetta normativa. In linea generale il problema riguarda gli oppioidi e/o le sostanze amfetamino-simili.

Uno dei motivi per i quali il black market è particolarmente interessato a sviluppare questi prodotti, risiede nel fatto che l'ottenimento di tali sostanze non è influenzato dalla posizione geografica (si tratta di sintesi chimiche e non di modificazioni o estrazioni di principi da prodotti naturali, come la cocaina, la cui coltivazione necessita di determinate condizioni climatiche); infatti i laboratori clandestini possono essere allestiti ovunque [**3**].

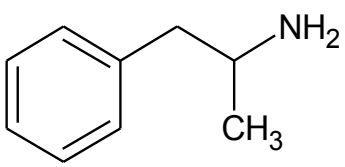
Storicamente il termine designer drugs è stato coniato per i nuovi oppiacei che sono apparsi sul mercato clandestino circa tre decenni fa; ora questo termine è usato in maniera più estesa. Il più vasto gruppo di designer drugs è rappresentato dai metilendiossiderivati dell'amfetamina e della metamfetamina.

Con il termine generico "amfetamine" si intende una serie di molecole strutturalmente correlate all'amfetamina (**Figura 1**), denominate fenilalchilammine; si tratta delle sostanze illecite più frequentemente utilizzate in Europa: dopo la cannabis occupano il secondo posto tra quelle più consumate (insieme alla cocaina).

L'amfetamina fu sintetizzata per la prima volta nel 1887, ma il primo utilizzo di questa molecola risale al 1910, quando si rese necessario trovare un sostituto sintetico dell'efedrina, un alcaloide contenuto in *Ephedra vulgaris*, molto efficace nella cura dell'asma ma di difficile estrazione.

Figura 1

Amfetamina

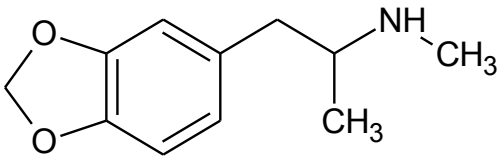


Negli anni ‘30 l’amfetamina venne utilizzata per scopi terapeutici nella cura di patologie molto diverse tra di loro (asma, depressione, narcolessia, obesità); inoltre nel periodo bellico ne venne fatto quello che si definisce “uso adattativo”: decine di milioni di compresse di amfetamina vennero prodotte e distribuite per aumentare l’efficienza dei soldati in combattimento e la produttività degli operai dell’industria bellica [**4**].

Il composto più famoso e probabilmente più usato appartenente alla famiglia delle amfetamine è la 3,4-metilendiossi-*N*-metilamfetamina (MDMA), meglio conosciuta come Ecstasy (**Figura 2**), che presenta un sostituente metilendiossi nella posizione 3,4 dell’anello aromatico. Tale derivato è strutturalmente correlato sia a sostanze stimolanti che allucinogene [**5-7**].

Figura 2

3,4-metilendiossi-*N*-metilamfetamina (MDMA)



L’MDMA fu il primo derivato amfetaminico ad essere studiato dalla Merck come farmaco anoressizzante [**8**,**9**], ma non giunse mai sul mercato con tale scopo. Ad eccezione di alcuni studi tossicologici sugli animali all’inizio degli anni ’40 [**10**], il composto venne ignorato sino al 1968, quando negli USA ne divenne palese l’uso extraclinico [**11**]. Intorno al 1980 piccole dosi di MDMA venivano usate legalmente in psicoterapia. Durante gli anni ‘70 l’MDMA era conosciuta ovunque negli Stati Uniti con diversi nomi “da strada”: XTC, Adam, MDM, Speed ed altri. Verso la metà degli anni ‘80 un vasto numero di laboratori clandestini provvedevano al rifornimento ed alla distribuzione sul mercato americano di MDMA e altri derivati simili. Dopo la vasta diffusione negli USA arrivò prepotentemente in Europa, dove venne sintetizzata clandestinamente in prevalenza nei Paesi nordici; in Italia la sua produzione si registra a partire dalla fine degli anni ’80. Tale sostanza è molto diffusa a livello mondiale, specie nella scena rave. Ha raggiunto tale notorietà per il basso costo di produzione e le semplici procedure sintetiche [**12**].

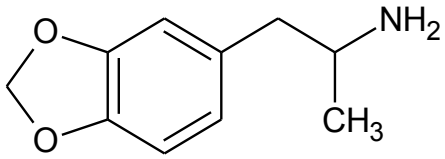
Tra i primi designer drugs conosciuti vi è anche la 3,4-metilendiossiamfetamina (MDA), che differisce dall’MDMA solo per l’assenza di un gruppo metilico sull’NH_2 (**Figura 3**).

Intorno al 1970 nel Nord America prese il via un vasto utilizzo di MDA, cui fecero seguito diversi casi di morte in California e Canada [**5**]. Nonostante la sua popolarità sia diminuita in seguito a questi casi di overdose, è ancora oggi segnalata tra i sequestri di “droghe sintetiche” in diversi

Paesi. Uno dei nomi da strada più comuni per questo composto era “Love drug” in quanto aveva la fama di provocare un’euforia sensuale che dura dalle sei alle otto ore.

Figura 3

3,4-metilendiossiamfetamina (MDA)



Le amfetamine hanno raggiunto una crescente popolarità, soprattutto tra i giovani, per le proprietà psicostimolanti (molto diffuso è il loro utilizzo nei cosiddetti rave party) e per il basso costo. Dopo il 1986 l’elevata richiesta di MDMA ha portato sul mercato illecito un vasto numero di derivati feniletilamminici, alcuni dei quali si ottengono da vie sintetiche più semplici ed economiche. Tuttavia, ciò che rende florido il mercato dei nuovi designer drugs dipende dal fatto che le nuove strutture molecolari, non essendo ancora registrate nelle Tabelle delle sostanze stupefacenti e psicotrope vietate, non sono di facile individuazione e, soprattutto, il loro spaccio non costituisce un reato penale. Alcune di queste sostanze sono derivati con uno o più gruppi metossilici legati all’anello aromatico, un alogeno, un gruppo tiolico variamente sostituito, un gruppo metilico ed eventuali sostituenti sulla catena etilamminica (in genere gruppi ossidrilici o metossilici). Al momento un numero limitato di questi derivati è noto in Europa ma il loro uso (e abuso) è in rapida e crescente diffusione tra i giovani [**5**].

Queste sostanze vengono preparate clandestinamente e sono distribuite sotto forma di capsule, polveri e, per lo più, compresse colorate, con nomi e disegni originali e accattivanti.

Nel 1985 l’Agenzia sul controllo dei farmaci americana (DEA) visto il potenziale d’abuso, la mancanza di usi terapeutici ed i numerosi casi di intossicazione ed overdose, inserì l’MDMA ed i relativi derivati con proprietà stimolanti nella lista delle sostanze psicotrope sottoposte a controllo internazionale [**13**].

Anche in Italia esiste una normativa specifica sulle sostanze d’abuso, che classifica le sostanze il cui “spaccio” è penalmente perseguibile e fissa, per ciascuna di queste, la quantità massima che può essere detenuta per il cosiddetto “uso personale” [**14**]. Tali tabelle comprendono anche numerosi derivati amfetaminici e vengono aggiornate quando si accerta la comparsa di nuove strutture.

ASPETTI FARMACOLOGICI DELLE AMFETAMINE

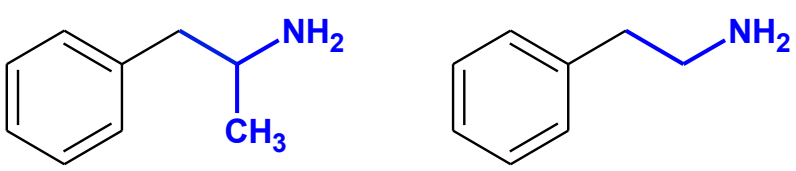
Le amfetamine sono potenti psicostimolanti che alterano notevolmente la funzione mentale e il comportamento. I meccanismi attraverso i quali esercitano i loro effetti sono molteplici e consistono tutti nell'incremento e nel potenziamento delle trasmissioni monoaminergiche [**15**-**17**]. I sistemi di trasmissione neuronale interessati sono quello noradrenergico, dopaminergico e, in misura minore, serotoninergico. Il meccanismo d'azione principale riguarda l'induzione al rilascio delle monoamine dalle vescicole presinaptiche al citosol [**18**] e l'inversione nella direzione di lavoro dei neurotrasportatori, che anziché ricaptare i neurotrasmettitori dall'esterno all'interno della cellula, li concentrano nello spazio intersinaptico [**19].** Ci sono inoltre studi che affermano che le amfetamine inibiscono gli enzimi deputati al metabolismo delle monoamine [**20**] e incrementano l'attività e l'espressione di un enzima fondamentale per la sintesi della dopamina, la tirosina idrossilasi [**21**]. In aggiunta, è stato dimostrato che sono in grado di bloccare i neurotrasportatori per la dopamina e di ridurne l'espressione sulla superficie cellulare [**22**,**23**]. Va peraltro considerato che le amfetamine hanno in genere un'emivita molto più alta di altri psicostimolanti, come la cocaina [**24**] (8-13 ore per la metamfetamina contro le 1-3 ore per la cocaina), il che porta chiaramente ad un prolungamento degli effetti fisici e psichici, che rendono queste sostanze più appetibili per il consumatore. Inoltre si tratta di molecole abbastanza liposolubili, che sono in grado di oltrepassare rapidamente la barriera ematoencefalica.

In generale le fenilalchilamine si dividono in due categorie (**Figura 4**):

1) fenilisopropilamine: di questo gruppo fa parte la stessa amfetamina; sono caratterizzate dall'avere un gruppo metilico in posizione α rispetto all'ammina;
2) feniletilamine: si tratta di derivati solitamente meno potenti delle corrispondenti fenilisopropilamine. Il composto più conosciuto è la mescalina, sostanza allucinogena di origine naturale estratta dal peyote, un cactus originario del Messico [**25**].

Figura 4

Struttura della fenilisopropilamina e della feniletilamina



Le risposte farmacologiche variano a seconda della molecola specifica, della dose e della modalità di assunzione (possono essere assunte per via orale, per via inalatoria e per via endovenosa). Tra le varie molecole amfetamino-simili, si possono individuare anche sostanziali differenze di potenza: la metamfetamina, ad esempio, è molto più potente dell'amfetamina.

A basse dosi tutte le amfetamine hanno effetti sul sistema cardiovascolare, determinando un aumento della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca, con concomitante rilassamento della muscolatura bronchiale. Inducono uno stato di eccitazione, euforia e benessere generalizzato [**26**], diminuzione dell'appetito, aumento della libido e dello stato di vigilanza, aumento dell'attività motoria, della comunicazione verbale e senso di potere e invincibilità. Alcune molecole, come l'MDMA, mostrano oltre agli effetti sopracitati un'attività allucinogena.

Il profilo di effetti positivi tende a variare all'aumentare della dose: già a dosi moderate si verificano lievi tremori, irrequietezza, insonnia e agitazione. Tutte le amfetamine prevengono la fatica, sopprimono l'appetito, stimolano la veglia e provocano deprivazione del sonno; proprio per questo tipo di effetti hanno subìto una rapida diffusione nella scena rave mondiale. Aumentando le dosi si ha una rapida insorgenza di disturbi d'ansia (si pensa a causa dello scompenso del sistema dopaminergico), con comportamenti ossessivi, crisi di panico, paranoia e sintomi psicotici, probabilmente anche essi dovuti all'incremento dopaminergico [**27**].

L'utilizzo cronico di amfetamine induce comportamenti stereotipati come movimenti ripetitivi, privi di scopo e continui, manie paranoidi, sintomi psicotici anche gravi, improvvisi scatti violenti e aggressivi. Si possono verificare anche anoressia grave e mancanza di sonno. Questo quadro sintomatologico porta inevitabilmente a un progressivo deterioramento della condizione sociale, lavorativa e personale.

Un'interruzione improvvisa dell'assunzione di alte dosi induce sia nell'uomo che nell'animale effetti fisici e psichici opposti rispetto a quelli acuti, come fatica, depressione, difficoltà di concentrazione; sono stati inoltre documentati casi di suicidio [**28**,**29**].

In passato sono stati studiati gli effetti dati dall'utilizzo di sostanze d'abuso amfetamino-simili durante la gravidanza. Si sono registrati ritardi nella crescita e minore peso alla nascita [**30**,**31**].

DIFFUSIONE DELLE AMFETAMINE

In Europa le amfetamine vengono prodotte nei laboratori clandestini fondamentalmente per "uso interno", anche se una certa quantità viene esportata in Medio Oriente. I Paesi che ricoprono un ruolo chiave nella produzione di queste sostanze sono il Belgio, i Paesi Bassi, la Polonia e i Paesi Baltici, anche se il fenomeno è presente e in crescita in altri Paesi, tra cui la Bulgaria, la Germania e l'Ungheria. La Repubblica Ceca segnala un gran numero di siti di produzione di metamfetamina, che spesso hanno lo scopo di rifornire direttamente le persone coinvolte. Dati recenti indicano che nei Paesi Baltici la produzione di metamfetamina è aumentata notevolmente, in quanto serve anche il mercato scandinavo, in cui potrebbe iniziare a sostituire l'amfetamina.

Per dare un'idea della rilevanza e della portata del fenomeno in Europa, è sufficiente dire che solo nel 2011 sono stati segnalati circa 45 000 sequestri di amfetamine.

Per quanto riguarda l'MDMA, i sequestri sono crollati a partire dal 2007; nell'ultimo anno sono stati sequestrati 4.3 milioni di compresse (una quantità minima rispetto a quella relativa all'anno di massima diffusione, il 2002, con 23 milioni di compresse sequestrate). Queste tendenze al ribasso sono state attribuite al rafforzamento dei controlli nei confronti non solo del prodotto finito, ma anche dei precursori chimici. I dati più recenti indicano però una ripresa della diffusione di questa sostanza. I produttori potrebbero aver aggirato i controlli sui precursori utilizzando "pre-precursori" o "precursori mascherati", ossia sostanze chimiche che possono essere importate legalmente come sostanze non controllate e quindi convertite nei precursori chimici necessari alla produzione di MDMA [**32**].

L'andamento del numero di consumatori di psicostimolanti che abbiano assunto tali sostanze almeno una volta negli ultimi 12 mesi ha registrato un trend al ribasso dal 2008. Nella Relazione Annuale dell'ODET (Osservatorio Delle Droghe e Tossicodipendenze) del 2010, accanto alle sostanze d'abuso più frequentemente e tradizionalmente segnalate e utilizzate (eroina, cocaina, preparati attivi della cannabis), si è delineata una sostanziale espansione del fenomeno dei designer drugs [**33**]. Si registrava infatti una netta diminuzione della coltivazione di oppio e una importante riduzione del consumo delle sostanze da esso derivate (narcotici morfino-simili) a livello globale, seppur con un lieve incremento in Russia e Europa Orientale [**34**]. Il consumo di cocaina invece è in aumento in Europa e nell'America del Sud, e in diminuzione nell'America del Nord.

Approfondendo l'analisi del consumo di sostanze stimolanti in Italia, riportata nell'ultima Relazione sullo Stato delle Tossicodipendenze in Italia del Dipartimento per le Politiche Antidroga, se ne osserva una diminuzione della diffusione rispetto all'anno 2010, che risulta essere più

marcata nelle femmine che nei maschi (-61.9% nei maschi vs -77.8% nella femmine). Nella popolazione 15-24 anni, si ha un maggiore consumo di sostanze stimolanti da parte del genere maschile, mentre è vero il contrario in una fascia d'età più avanzata (25-34 anni) [**35**].

Un dato allarmante emerge però dall'ultimo studio sulla popolazione studentesca di Espad (European school survey on alcohol and other drugs), realizzato in Italia dall'Istituto di Fisiologia Clinica del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Pisa, che segnala come circa il 15.4 % dei ragazzi assuma psicofarmaci senza alcuna prescrizione medica. Dal campione di adolescenti intervistato si evince un aumento, seppur lieve, del consumo di amfetamine rispetto agli anni precedenti (3.8% nella vita e 2.6% nell'ultimo anno, contro 3.6% e 2.4% del precedente sondaggio) [**36**].

Un aspetto interessante è che tra le circa 170 sostanze psicoattive sintetiche individuate dal 1997, più della metà sono apparse nel mercato clandestino nell'ultimo decennio. Si tratta di un dato allarmante che testimonia l'estremo interesse del mercato illecito nelle droghe di sintesi [**37**].

CHIRALITÁ

Come già anticipato, in generale le amfetamine si possono classificare in fenilisopropilamine (ad esempio l'amfetamina) e feniletilamine (ad esempio la mescalina), generalmente meno potenti delle prime.

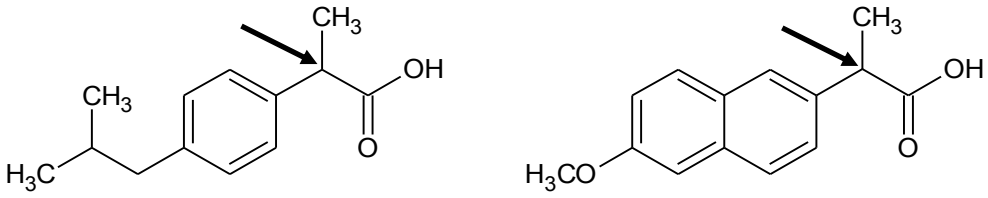
Il primo gruppo è caratterizzato dalla presenza di un centro chirale, dunque le molecole che ne fanno parte esistono sotto forma delle due isoforme (S e R). Anche alcune feniletilamine presentano un sostituente (diverso da un gruppo metilico) sulla catena laterale, generalmente in posizione β; possono esistere, quindi, anche feniletilamine chirali.

CHIRALITÁ NEI SISTEMI BIOLOGICI

Il concetto di chiralità è molto importante dal punto di vista farmacologico e, quindi, farmaceutico. L'organismo può essere definito come un "ambiente chirale". Le sostanze farmacologicamente attive per esplicare un'attività devono inteagire con degli specifici recettori tramite un legame, generalmente reversibile, ma in ogni caso altamente specifico. Il farmaco deve avere dunque una struttura chimica complementare al sito recettoriale. Proprio tale complementarietà è alla base della specificità dell'interazione. Un recettore che possiede siti di legame specifici per tre dei quattro sostituenti presenti su un centro chirale sarà dunque in grado di discriminare tra i due enantiomeri di una molecola. Per questo motivo un farmaco otticamente attivo può esplicare un'attività diversa, a seconda che il recettore interagisca con l'enantiomero S o con l'enantiomero R. Tale differenza si può evidenziare con un'attività ridotta o addirittura con la totale mancanza dell'attività desiderata per uno dei due enantiomeri. Ad esempio, mentre l'(S)-ibuprofene e l'(S)-naprossene (**Figura 5**) sono dei farmaci dotati di attività analgesica ed antipiretica (eutomeri), il loro enantiomero R è sostanzialmente inattivo (distomeri) [**38**].

Figura 5

Ibuprofene e Naprossene

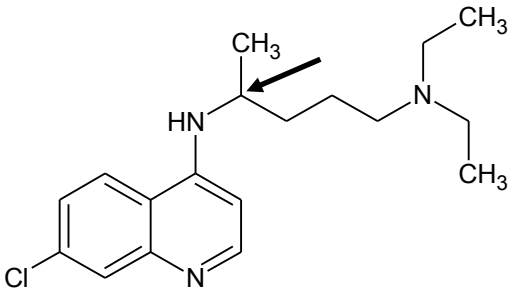


L'(S) ibuprofene risulta essere addirittura 160 volte più potente del suo antipodo ottico [**39**]. Per tale ragione risulta necessario conoscere la composizione enantiomerica di questi farmaci, al fine

di poter determinare accuratamente la loro effettiva efficacia [**40**]. A volte un principio attivo è presente nel medicinale come miscela racemica se i due enantiomeri hanno simili caratteristiche di efficacia e di tossicità. In questi casi la separazione degli enantiomeri ottenuti dal processo di sintesi non fornirebbe vantaggi ma solo un costo maggiore. La clorochina (**Figura 6**), ad esempio, è un antimalarico disponibile in commercio come miscela racemica.

Figura 6

Clorochina



Riassumendo, è quindi possibile che i due enantiomeri di un composto chirale farmacologicamente attivo abbiano differente attività, differenti effetti farmacologici, differente potenza, o un effetto limitato a uno solo dei due isomeri ottici anche in termini di tossicità [**41**]. É stato dimostrato che questo discorso è valido anche per I derivati amfetaminici. La dexamfetamina (l'enantiomero destrogiro dell'amfetamina) è uno stimolante del sistema nervoso centrale usato nella terapia della narcolessia [**42**] e della sindrome da deficit di attenzione e iperattività [**43**]. Lo stesso effetto non è attribuibile all'enantiomero levogiro. Importanti differenze sono anche riconosciute dal punto di vista legale: in Giappone, per esempio, la diffusione dei due enantiomeri del 2-amino-1-fenilpropan-1-olo è regolamentata da disposizioni di legge differenti [**44**]**.**

È perciò molto importante mettere a punto delle metodiche analitiche caratterizzate da alta efficienza e capacità di risoluzione per la separazione enantiomerica di miscele racemiche di farmaci d'abuso e non, a bassi costi e brevi tempi di analisi, in maniera che possano divenire delle metodiche sfruttabili routinariamente nell'ambito della medicina legale. La conoscenza della composizione enantiomerica di una droga di sintesi, inoltre, può rivelarsi interessante anche per propositi investigativi, dal momento che l'eccesso fornisce indicazioni sulla via sintetica utilizzata, le quali potrebbero essere utili per trarre ulteriori informazioni sul laboratorio di origine [**45**].

In letteratura sono riportati numerosissimi lavori sulla separazione chirale di amfetamina e derivati. Le metodiche analitiche che si prestano a questo genere di separazione sono moleplici: dalla cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) [**41**, **46**-**48**], alla gas cromatografia (GC) [**49**-

52], all'elettroforesi capillare [**44**,**45**,**53**-**56**]. Quest'ultima tecnica è vantaggiosa ed economica, in quanto utilizza minimi volumi di solventi, prevalentemente acquosi, e di campione.

L'ELETTROFORESI CAPILLARE NELLE SEPARAZIONI CHIRALI

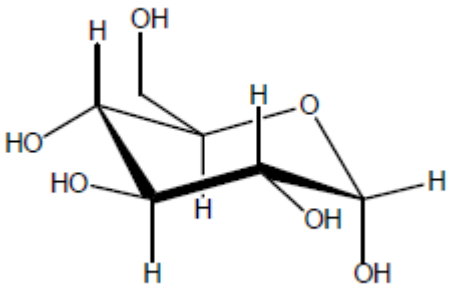
In linea generale, in elettroforesi capillare le separazioni enantiomeriche possono essere eseguite con due tipi differenti di approcci: diretto e indiretto. In quest'ultimo gli enantiomeri vengono convertiti tramite una specifica reazione chimica in diastereoisomeri, che hanno caratteristiche ben diverse e che possono quindi essere separati in un mezzo achirale in base loro alla differente mobilità elettroforetica. Nell'approccio diretto, invece, un selettore chirale viene solubilizzato nel buffer elettroforetico. Tale selettore interagisce in maniera diversa con i due enantiomeri formando complessi diastereoisomerici labili e reversibili o complessi di inclusione, dotati di mobilità effettive diverse a seconda dell'enantiomero considerato.

La scelta del selettore chirale non può prescindere dalle caratteristiche della molecola target, anche se molecole simili si comportano in maniera molto diversa con selettori chirali simili, il che rende pressochè impossibile prevedere quale sarà il selettore chirale migliore e quali saranno le condizioni ottimali. I parametri che vengono modificati per ottimizzare il metodo sono in genere il pH, la concentrazione e la composizione del buffer, la temperatura, il voltaggio applicato, la lunghezza del capillare e il tipo e la concentrazione del selettore chirale [**57**]. I selettori chirali più comuni sono: ciclodestrine [**58**], polisaccaridi [**59**] o oligosaccaridi, eteri corona [**60**].

Le ciclodestrine sono le più utilizzate. Si tratta di oligosaccaridi ciclici formati da 6, 7 o 8 monomeri di D-(+)glucopiranosio (**Figura 7**) uniti tra loro con un legame α, 1-4 glucosidico e chiusi ad anello. Sono prodotti di degradazione enzimatica dell'amido di patata o di mais ad opera della ciclo destrina-glicosil-transferasi (CGT).

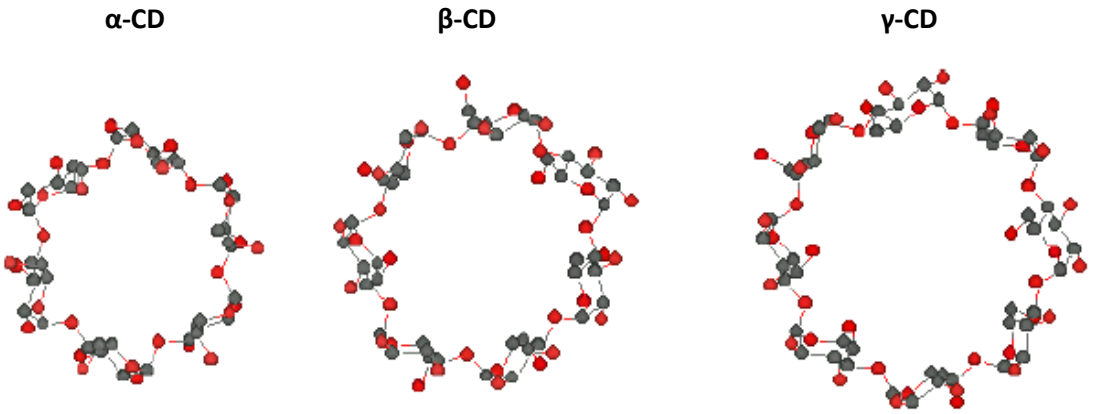
Figura 7

D-(+)glucopiranosio



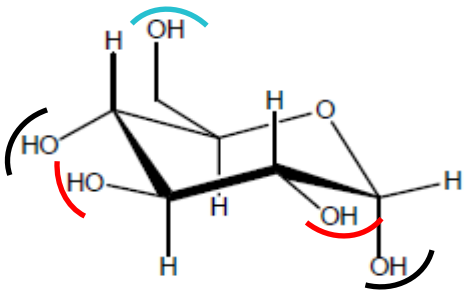
Sono caratterizzate dall'avere una struttura troncoconica. In base al numero di monomeri (6, 7 o 8) sono dette alfa, beta o gamma CD. Le tre classi di CD differiscono tra loro per grandezza dell'anello (**Figura 8**) e dunque della cavità (pari a 5.70, 7.80 e 9.50 Å rispettivamente) e per la solubilità in acqua, pari a 18.5 g/l per la β, 145 g/l per l'α e 232 g/l per la γ. A temperatura ambiente si presentano come polveri bianche cristalline inodori dal sapore debolmente dolce.

Figura 8



Nell'unità glucosidica coniugata ad altre nel formare le ciclodestrine si evidenziano tre gruppi OH liberi (quelli in 1 e in 4, evidenziati in nero, sono impegnati nel legame α 1-4) (**Figura 9**): quello in C6, che è primario (evidenziato in azzurro), e quelli in C2 e in C3, che sono secondari (evidenziati in rosso).

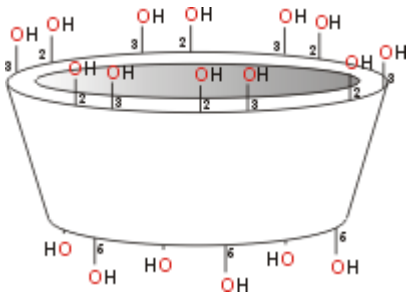
Figura 9



Gli ossidrili primari (C6) si trovano sul lato più stretto della cavità, mentre quelli secondari (C2 e C3) si trovano sul lato più largo del tronco di cono (**Figura 10**). In ogni caso, tutti gli ossidrili si trovano sulla superficie esterna, che presenta quindi carattere idrofilo. La cavità interna, invece, ha spiccato carattere idrofobo. Ciò si traduce nella possibilità per le CD di ospitare molecole

idrofobe all'interno della cavità e di essere solubili in acqua [**61**]. Gli ossidrili primari sono più "mobili" rispetto ai secondari, quindi permettono alla cavità di allargarsi leggermente.

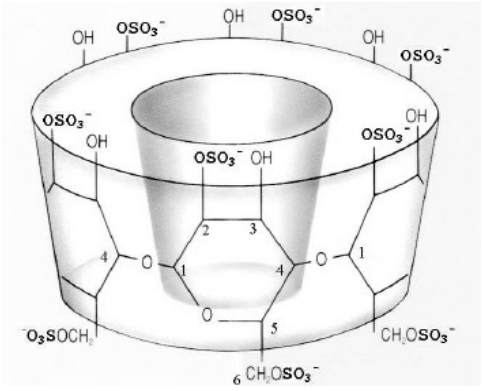
Figura 10



Esistono in commercio molti tipi di ciclodestrine oltre a quelle "native" (ossia non funzionalizzate); si tratta di derivati variamente sostituiti sugli ossidrili, che possono avere caratteristiche acide o basiche. A seconda del tipo di sostituente possiamo quindi classificare le ciclodestrine in neutre, cariche positivamente e cariche negativamente, come quella rappresentata nella **Figura 11**.

Figura 11

Esempio di ciclodestrina carica negativamente



DETERMINAZIONE DELLE AMFETAMINE NELLE MATRICI BIOLOGICHE

Le matrici biologiche che possono essere sfruttate per la conferma dell'assunzione di derivati amfetaminici sono molteplici; le più tradizionalmente studiate sono il sangue e l'urina, ed entrambe presentano vantaggi e svantaggi.

Il **sangue** consente di determinare la presenza di questa classe di sostanze nell'ordine di poche ore dal momento dell'assunzione, e quindi di dimostrare solo un'esposizione relativamente recente. Inoltre il prelievo è invasivo e non si possono ottenere grandi volumi di campione. Uno dei vantaggi fondamentali è che si tratta di una matrice non soggetta a modificazioni e/o adulterazioni.

L'**urina** è la matrice di elezione per la conferma dell'assunzione di amfetamine, anche se si vuole dimostrare lo stato di assuntore cronico (in questo caso vengono fatti prelievi seriati a sorpresa). Dopo somministrazione orale, l'eliminazione urinaria ha inizio dopo circa 30 minuti dall'assunzione, prevalentemente in forma immodificata [**62**]; pertanto nei campioni biologici l'analita target da identificare sarà il "parent drug". L'escrezione urinaria delle amfetamine nell' urina è funzione del pH urinario:

· a pH 6 le amfetamine sono eliminate rapidamente (emivita 8-10 h) e prevalentemente in forma immodificata;

· a pH > 7.5 sono eliminate lentamente (emivita 16-31 h).

Quando il pH urinario è acido, l'80% della dose assunta viene eliminata in circa 24 h, quando il pH urinario è alcalino, l'80% della dose assunta viene eliminata in circa 5 giorni. In condizioni di pH urinario variabili, circa il 30% della sostanza assunta viene escreta in forma immodificata nelle prime 24 h dall'assunzione e, della restante quantità, circa il 90% tra farmaco e metaboliti nei successivi 2-3 giorni. Gli indubbi vantaggi di questa matrice sono costituiti dal fatto che il prelievo non è invasivo, che si possono campionare grandi volumi e che si può individuare l'analita o i suoi metaboliti anche a diversi giorni dall'assunzione.

Negli ultimi anni si è sviluppata l'esigenza di avere a disposizione differenti matrici che permettano di attestare l'assunzione di sostanze stupefacenti e che siano in grado di fornire informazioni diverse rispetto a quelle estrapolabili dalle matrici tradizionali. In questo contesto è stata introdotta nella routine dell'analisi tossicologica e forense l'analisi del **capello**, che consente di valutare l'esposizione a xenobiotici in diverse circostanze, come l'esposizione cronica a inquinanti ambientali [**63**], ma soprattutto consente di determinare l'assunzione di farmaci d'abuso [**64**] in caso di reati indotti dall'assunzione di sostanze psicotrope, nelle analisi routinarie di medicina del lavoro, nelle analisi tossicologiche, in caso di riabilitazione alla guida e nella

tossicologia forense [**63**]. La matrice capello presenta numerosi vantaggi rispetto alle matrici tradizionali [**65**]: il prelievo non è invasivo ed è ripetibile se sono richieste eventuali conferme dei risultati. La matrice cheratinica consente inoltre di provare l'assunzione cronica ed è meno passibile di adulterazioni o risultati negativi dati da una breve astinenza prima del prelievo rispetto ad altre matrici. Farmaci e metaboliti rimangono infatti in tale matrice per un tempo indefinito, fornendo una finestra di rivelazione che va da settimane a mesi a seconda degli analiti target. Si tratta di un periodo di determinazione molto più ampio rispetto a quello fornito dal sangue o dall'urina, in cui la concentrazione dell'analita diminuisce rapidamente in un periodo di tempo più breve (da ore a giorni). Uno degli svantaggi più importanti, che incide sulla facilità di messa a punto di un metodo analitico, è che non sempre è possibile disporre di "quality control materials" (QCMs), ed è spesso difficile ottenerli per specifiche droghe meno diffuse, come nuovi designer drugs. Per quanto riguarda la sperimentazione *in vivo*, in letteratura è riportato che è possibile considerare i peli di ratto come matrice alternativa [**63**,**66**].

La legislazione italiana ha da poco inserito il **fluido orale** come possibile campione biologico alternativo nelle analisi di tossicologia forense [**67**]. Linee guida che stabiliscano come effettuare il prelievo e l'analisi e che diano informazioni su quale dispositivo debba effettivamente essere usato e su quali cut-off sia opportuno considerare, sono purtroppo ancora sfocate e poco precise. Il vantaggio fondamentale di questa matrice è l'impossibilità da parte del soggetto di adulterarla, poiché il prelievo può essere effettuato direttamente dall'operatore.

Nei laboratori di tossicologia forense, di medicina legale o di medicina del lavoro, normalmente vengono effettuati due tipi di esami: saggi immunenzimatici di screening e metodi cromatografici di conferma e quantificazione.

TEST DI SCREENING

I **saggi immunoenzimatici** sono dei test biochimici che sono in grado di indicare la presenza di un determinato analita attraverso una reazione immunologica: proprio per questo motivo tali test sono altamente sensibili e specifici.

L'elevata specificità dipende dall'utilizzo di anticorpi e antigeni purificati. Gli anticorpi (anche noti col nome di immunoglobuline) sono delle molecole di natura proteica prodotte dalle cellule B e utilizzate dal sistema immunitario per identificare e neutralizzare corpi estranei all'organismo. La molecola anticorpale riconosce una specifica porzione del target chiamata antigene. I test immunoenzimatici misurano la formazione del complesso antigene-anticorpo, che viene rivelato grazie a una reazione indicatrice. L'alta sensibilità si ottiene utilizzando un sistema che determina un'amplificazione della risposta prodotta. La grande specificità dell'interazione antigene-anticorpo permette di sfruttare queste tecniche anche quando si lavora con miscele complesse. I test in questione sono quindi particolarmente adatti alla rivelazione di sostanze in matrici biologiche, come saliva e urina.

I test immunoenzimatici possono essere di tipo qualitativo (danno un risultato positivo o negativo) o quantitativo (forniscono una risposta proporzionale alla quantità misurata). Normalmente nella routine dei laboratori di tossicologia forense, di medicina legale e di medicina del lavoro si utilizzano i kit "qualitativi" (più economici), e solo i risultati positivi vengono sottoposti a conferma ed eventuale quantificazione, con metodiche cromatografiche che prevedono l'utilizzo di strumenti come la gas cromatografia accoppiata spettrometro di massa (GC-MS) o la cromatografia liquida interfacciata con rivelatore di massa (LC-MS).

I kit immunoenzimatici disponibili in commercio sono studiati per individuare la presenza delle più comuni sostanze d'abuso ai cut-off stabiliti per legge: cocaina, eroina, metadone, THC, fenciclidina, amfetamina, metamfetamina, ecstasy.

In letteratura sono riportati numerosi studi che riguardano le caratteristiche e performance dei kit più comunemente utilizzati per sostanze d'abuso conosciute [**68**-**73**]. La maggior parte di questi studi riportano un buon accordo tra i risultati forniti da questi test di screening e le analisi di conferma.

Un test molto utilizzato è il test EMIT che, come gli altri test immunoenzimatici, utilizza anticorpi che sono stati progettati per legare specificatamente le molecole che si vogliono investigare, senza legare altre sostanze presenti nel campione.

Esistono due tipi di dosaggi EMIT per l'individuazione di sostanze amfetamino-simili nell'urina: uno è specifico per le molecole amfetaminiche propriamente dette (EMIT® II Plus Amphetamines Assay), mentre l'altro è specifico per i derivati metilendiossi sostituiti (EMIT® II Plus Ecstasy Assay). Uno dei vantaggi principali di questi test di screening è il breve tempo richiesto (circa 1 minuto per ogni campione analizzato), i limiti di determinazione molto bassi (al di sotto dell'ordine di concentrazione ng/ml) e la facilità di utilizzo. I test EMIT utilizzano una strumentazione abbastanza sofisticata; i kit prevedono invece l'immersione di una estremità spugnosa o assorbente nella matrice da analizzare.

SAGGI DI CONFERMA E QUANTIFICAZIONE

Come già accennato, le tecniche analitiche che possono essere sfruttate per l'analisi, la determinazione e la quantificazione delle amfetamine nelle matrici biologiche sono molteplici. In genere si tratta di tecniche elettroforetiche (elettroforesi capillare, CE) e cromatografiche (gas cromatografia, GC, cromatografia liquida, LC). Queste ultime possono essere accoppiate a diversi tipi di rivelatore: detector diode array (DAD), spettrometro di massa (MS), spettrometro di massa tandem (MS/MS).

La spettrometria di massa ha caratteristiche che la rendono particolarmente adatta agli scopi indicati in quanto, accanto all'indubbia selettività che permette di riconoscere la struttura di ogni sostanza anche se presente in miscela con molte altre, è dotata di un'alta sensibilità, tanto da essere spesso considerata la tecnica di elezione per l'analisi di sostanze di qualsivoglia struttura molecolare in matrici dalla variabile complessità, come quelle di origine biologica.

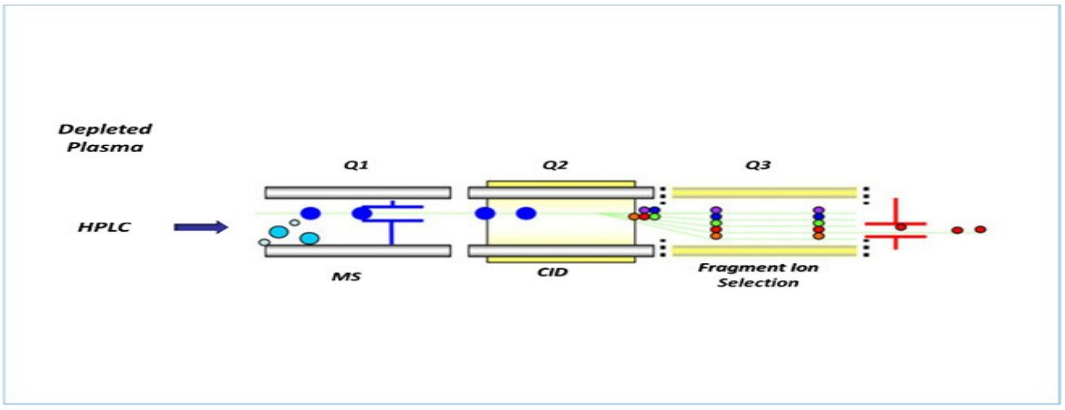
In passato la tecnica più utilizzata era la gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa [**74**-**83**], che richiede spesso uno step di derivatizzazione, il quale rende l'intero processo più lungo, difficoltoso e costoso. Tale step prevede una reazione chimica che non sempre ha rese quantitative; ciò inficia quindi anche l'affidabilità del metodo e dei risultati. Per tutti questi motivi la GC è stata progressivamente soppiantata dalla cromatografia liquida (LC), che non richiede alcuna derivatizzazione; la procedura risulta più veloce, più semplice e più economica [**84**]. L'accoppiamento LC-MS (liquido-massa) è stato sviluppato in tempi relativamente recenti. Non è infatti possibile introdurre nello spettrometro di massa, che è un sistema ad alto vuoto, un liquido (tale problema non si pone nel sistema GC-MS in quanto gli analiti arrivano allo spettrometro già in fase gassosa). Si è ovviato a tale problema grazie alla messa a punto di un particolare sistema di ionizzazione: la ionizzazione electrospray (ESI). Questa prevede l'applicazione di una tensione ionizzante lungo l'ago nebulizzatore collegato all'uscita del cromatografo che determina la formazione di una nebulizzazione molto fine da cui il solvente può essere rapidamente rimosso. Le piccole particelle vengono quindi ionizzate da una scarica a corona a pressione atmosferica e trascinate dal flusso continuo delle particelle e da un basso potenziale elettrico che spinge le particelle cariche positivamente, attraverso un piccolo orifizio, verso lo spettrometro di massa sotto vuoto. Un'ulteriore evoluzione di questa vantaggiosa tecnica, consiste nell'accoppiare alla cromatografia liquida un detector di massa "triplo quadrupolo (**Figura 12**) (LC-MS/MS) [**85**-**87**].

Tale tecnica consente di lavorare in modalità "single reaction monitoring" (SRM). In questo caso l'identità della molecola, e dunque il suo peso molecolare, sono noti a priori ed il primo quadrupolo è fissato su di un valore determinato di *m/z*; il terzo quadrupolo seleziona solo un

determinato frammento. Nel caso venga selezionato più di un frammento si parla di "multiple reaction monitoring" (MRM).

Figura 12

Rappresentazione schematica di un detector di massa triplo quadrupolo



Durante un'analisi, quindi, il riconoscimento della molecola target non avviene più in base al suo peso molecolare, ma in base a frammentazioni specifiche, il che permette di aumentare notevolmente la specificità del sistema di rivelazione [**88**]. L'eccezionale sensibilità permette di rendere routinarie determinazioni di concentrazioni dell'ordine di picogrammi. Inoltre con questo tipo di rivelatore non si richiede la completa risoluzione dei cromatogrammi, riducendo di conseguenza la durata delle corse e della preparazione dei campioni, nonché della messa a punto del metodo.

SCOPO DEL LAVORO

Questo lavoro di tesi si inserisce in uno studio sviluppato dal gruppo di ricerca del Dipartimento di Chimica e Farmacia coordinato dal Prof. Boatto, che riguarda la sintesi di nuovi designer drugs non ancora disponibili quali standard analitici, nonché la messa a punto e la validazione di metodologie analitiche atte a identificare e quantificare tali sostanze nelle matrici biologiche. In tale contesto, in particolare, le prove *in vivo* consentono di raggiungere importanti obiettivi:

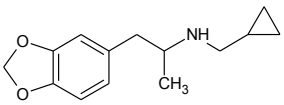
- La disponibilità di metodi analitici che permettono di intercettare le nuove molecole non ancora diffuse nel mercato illecito aiuta la repressione e il controllo del fenomeno dell'incremento della disponibilità di nuovi designer drugs.
- La possibilità di espletare accertamenti analitici che rendono possibile riconoscere un'assunzione recente, o condizioni di pregresso uso/abuso.
- Il monitoraggio tra i giovani e l'individuazione dei principi attivi che spesso sono responsabili di intossicazioni acute e decessi.

Il progetto ha previsto la sintesi di sette nuovi designer drugs amfetamino-simili. Tre di questi appartengono alla famiglia delle metilendiossi-amfetamine (MDAs), tutte recanti un sostituente metilendiossi in posizione 3,4 dell'anello aromatico e variamente sostituite sull'azoto della catena laterale, e sono: la 3,4-metilendiossi-*N*-ciclopropilmetilamfetamina (MDCPM), la 3,4-metilendiossi-*N*-isopropilamfetamina (MDIP), la 3,4-metilendiossi-*N*-benzilamfetamina (MDBZ), riportate in **Figura 13** insieme alla molecola utilizzata come standard interno. La 3,4-metilendiossi-*N*-etilamfetamina (MDE) è uno dei derivati amfetamino-simili più diffusi e studiati, ed è stata introdotta nel gruppo di molecole oggetto di studio come parametro di riferimento, proprio in virtù dei numerosi dati disponibili su di essa.

Le restanti quattro molecole sono feniletilamine variamente sostituite sull'anello aromatico, accumunate dalla presenza di un sostituente ossigenato sulla catena laterale. Si tratta della 4-bromo-2,5-beta-trimetossifeniletilamina (BOB), 4-metil-2,5-beta-trimetossifeniletilamina (BOD), 3,4-metilendiossi-beta-metossifeniletilamina (BOH), e 4-metil-2,5-dimetossi-beta-idrossifeniletilamina (BOHD), riportate nella **Figura 14**. Queste molecole sono state sintetizzate per la prima volta dal chimico e farmacologo americano Alexander Shulgin [**89**]. Il prefisso "BO" è usato da Shulgin per indicare la presenza di un atomo di ossigeno sul carbonio benzilico della feniletilamina. La terza lettera "X" indica i differenti sostituenti dell'anello aromatico che caratterizzano ogni molecola.

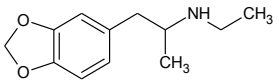
Figura 13

Analiti target metilendiossi sostituiti e IS



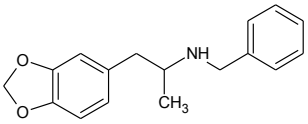
MDCPM

233.3 g/mol



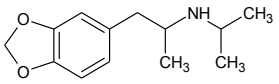
MDE

207.3 g/mol



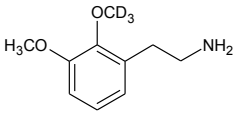
MDBZ

269.3 g/mol



MDIP

221.3 g/mol

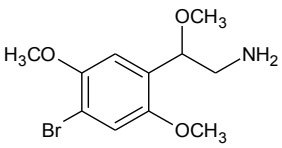


IS

184.2 g/mol

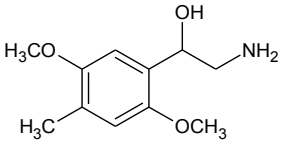
Figura 14

Analiti target ossigenati sulla catena laterale



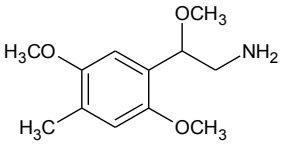
BOB

290.2 g/mol



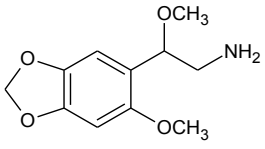
BOHD

211.3 g/mol



BOD

225.3 g/mol



BOH

192.2 g/mol

I prodotti sono stati preparati al livello di standard analitici in taluni casi seguendo le vie sintetiche proposte da Alexander Shulgin [**89**], in altri casi sviluppando nuovi step di sintesi e purificazione.
Per le MDAs è stato messo a punto e validato un metodo estrattivo analitico per l'analisi multiresiduo nella matrice urina, utilizzando come standard interno la 2,3-dimetossifeniletilamina-d_3 (2,3-DMPEA-d_3), riportata in **Figura 13**. Questo metodo è stato quindi applicato a uno studio di *clearance* renale sul ratto dopo somministrazione *in vivo*.
Per le BOX, invece, è stato ottimizzato e validato un metodo di estrazione e analisi multiresiduo nella matrice plasma, utilizzando lo stesso standard interno (2,3-DMPEA-d_3); tale metodo è stato successivamente applicato ad uno studio farmacocinetico sul ratto, dopo una singola somministrazione orale.

Negli anni il gruppo di ricerca coordinato dal Prof. Boatto ha sintetizzato numerosi nuovi designer drugs amfetamino-simili con i quali, nell'ambito di questo progetto, sono stati saggiati diversi kit immunoenzimatici disponibili commercialmente e comunemente utilizzati nei laboratori di tossicologia forense, medicina legale e medicina del lavoro. Lo scopo di questa ricerca è quello di dimostrare che l'alta specificità di questi kit per la molecola per la quale sono stati progettati fa sì che siano in realtà poco o per niente affidabili quando il soggetto ha assunto delle altre molecole che presentano anche solo minime differenze strutturali rispetto agli analiti target. Tale aspetto diviene drammaticamente importante se si considera il fatto che solo ed esclusivamente i risultati positivi vengono confermati con tecniche cromatografiche. Per questo motivo 41 nuovi designer drugs sono stati saggiati con i test EMIT (per l'amfetamina e per l'ecstasy) e con altri 3 differenti kit (ognuno dei quali specifico per amfetamina, metamfetamina ed ecstasy) sulla matrice urina, e con 2 differenti kit (ognuno dei quali specifico per amfetamina e metamfetamina) sulla matrice saliva.

Un altro aspetto che è stato approfondito in questo triennio di ricerca è la separazione enantiomerica di amfetamine tramite elettroforesi capillare, utilizzando diversi tipi di ciclodestrine come selettori chirali. Come già accennato in precedenza, tutte le amfetamine ed alcune feniletilamine presentano un centro chirale, quindi possono esistere in due isoforme (enantiometro S ed enantiometro R). La possibilità che due enantiomeri di una molecola amfetaminica presentino effetti quali-quantitativi differenti è ampiamente documentata [**42**-**44**]. Per questo motivo è molto importate disporre di procedure analitiche per la separazione enantiomerica di miscele racemiche, dotate di buone capacità risolutive ed alta efficienza, che siano applicabili a bassi costi e con brevi tempi di analisi. La conoscenza della composizione

enantiomerica di una sostanze di sintesi può rivelarsi importante dal punto di vista investigativo, in quanto fornisce indicazioni sulla via sintetica utilizzata, le quali potrebbero essere utili per trarre ulteriori informazioni sul laboratorio di origine [**45**].

MATERIALI E METODI

Le amfetamine oggetto di studio sono state sintetizzate nei nostri laboratori al massimo grado di purezza secondo metodiche descritte da Shulgin [**89**]: p-metossiamfetamina (PMA), p-metossimetamfetamina (PMMA), 2,5-dimetossiamfetamina (2,5-DMA), 2,5-dimetossi-4-bromoamfetamina (DOB), 2,5-dimetossi-4-cloroamfetamina (DOC), 2,5-dimetossi-4-etilamfetamina (DOET), 2,5-dimetossi-4-iodoamfetamina (DOI), 2,5-dimetossi-4-metilamfetamina (DOM), 2,5-dimetossi-4-nitroamfetamina (DON), 2,5-dimetossi-4-propilamfetamina (DOPR), 4-bromo-2,5-dimetossifeniletilamina (2C-B), 2,5-dimetossi-4-clorofeniletilamina (2C-C), 2,5-dimetossi-4-iodofeniletilamina (2C-I), 2,5-dimetossi-4-nitrofeniletilamina (2C-N), 2,5-dimetossi-4-metilfeniletilamina (2C-M), 2,5-dimetossi-4-metiltiofeniletilamina (2C-T), 2,5-dimetossi-4-etiltiofeniletilamina (2C-T-2), 2,5-dimetossi-4-isopropiltiofeniletilamina (2C-T-4), 2,5-dimetossi-4-cicloesiltiofeniletilamina (2C-T-5), 2,5-dimetossi-4-*N*-propiltiofeniletilamina (2C-T-7), 2,5-dimetossi-4-ciclopropilmetiltiofeniletilamina (2C-T-8), 2,5-dimetossi-4-(2-metossietil)tiofeniletilamina (2C-T-13), 2,5-dimetossi-4-i-butiltiofeniletilamina (2C-T-17), 2,5-dimetossi-4-metiltioamfetamina (ALEPH), 2,5-dimetossi-4-etiltioamfetamina (ALEPH-2), 2,5-dimetossi-4-isopropiltioamfetamina (ALEPH-4), 2,5-dimetossi-4-cicloesiltioamfetamina (ALEPH-5), 2,5-dimetossi-4-*n*-propiltioamfetamina (ALEPH-7), 2,5-dimetossi-4-ciclopropilmetiltioamfetamina (ALEPH-8), 2,5-dimetossi-4-(2-metossietil)tioamfetamina (ALEPH-13), 2,5-dimetossi-4-isobutiltioamfetamina (ALEPH-17), 3,4,5-trimetossiamfetamina (TMA), 2,4,5-trimetossiamfetamina (TMA-2), 2,3,4-trimetossiamfetamina (TMA-3), 2,4,6-trimetossiamfetamina (TMA-6), 3,4-metilendiossi-*N*-isopropilamfetamina (MDIP), 3,4-metilendiossi-*N*-benzilamfetamina (MDBZ), 3,4-metilendiossi-*N*-ciclopropilmetilamfetamina (MDCPM), 2-(3,4-metilendiossifenil)-2-metossietilamina (BOH), 2-(4-bromo-2,5-dimetossifenil)-2-metossietilamina (BOB), 2-(2,5-dimetossi-4metilfenil)-2-metossietilamina (BOD). I reattivi impiegati per la sintesi sono stati acquistati dalla Aldrich Chimica (Sigma Aldrich, Milano, Italia). I punti di fusione sono determinati con apparecchio "Kofler" e sono non corretti. I composti sono stati purificati per cristallizzazione o flash cromatografia su gel di silice ICN 32-63,60 Å, eluendo con miscele appropriate di solventi. La loro purezza è stata controllata mediante cromatografia su strato sottile usando lastre di gel di silice 60F 254 Merk (5 x 10 cm x 0.25 mm di spessore). Gli spettri IR sono registrati in film sottile o in dispersione di KBr all'1% utilizzando uno spettrofotometro Jasco FT–IR 460 plus. Gli spettri ^{1}H-NMR (in soluzione di $CDCl_3$ o MEOD) sono determinati con uno spettrometro Bruker AMX 400 (Bruker, Bremen, Germania) utilizzando TMS

con standard interno; i chemical shifts sono espressi in unità δ (ppm). Tutti i dati spettroscopici confermano le strutture assegnate.

L'acqua Milli-Q è stata preparata con un "Ultra-Pure water System" Millipore (Millipore, Billerica, MA, USA) a partire da acqua bidistillata e deionizzata. Gli altri reattivi e solventi usati sono stati acquistati al massimo grado di purezza presente in commercio. Il pH dei tamponi viene misurato con un pH-metro modello "HANNA" Instruments 8417.

L'estrazione delle amfetamine dei campioni di urina e plasma è stato condotto utilizzando delle colonnine SPE Strata C18-E (55 µm 70 Å) 100mg/ml della Phenomenex per le amfetamine metilendiossi sostituite, e colonnine SupelTM-Select HLB SPE (30 mg/ml) (Supelco, Bellafonte, PA) per fenetilamine BOX, montate su un VacElut vacuum "Supelco" modello VISIPREP (Supelco per Sigma Aldrich, Milan, Italy).

Le soluzioni delle amfetamine (1.0 mg/ml) sono state preparate in metanolo, conservate in congelatore a +4°C, e diluite alle opportune concentrazioni prima dell'uso. I campioni di urina e di plasma vengono prelevati da soggetti sani che non assumono farmaci. Le matrici sono state utilizzate per la preparazione di bianchi e degli spike analitici, fortificandole con le soluzioni degli stupefacenti a determinate concentrazioni.

Le ciclodestrine (β-ciclodestrinasolfato, carbossimetil-β-ciclodestrina e dimetil-β-ciclodestrina) sono state acquistate dalla Sigma Aldrich. Per evitare possibili variazioni dei risultati determinate da differenze proprie del lotto di produzione, dovute ad una solfatazione random della ciclodestrina, tutti gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando ciclodestrine provenienti da un unico lotto.

EMIT

Per le prove con i test EMIT sono stati utilizzati i saggi EMIT® II Plus Amphetamines assay (AMP assay) e EMIT® II Plus Ecstasy assay (EX assay) (Siemens, Newark, DE), in accordo con le istruzioni fornite dal costruttore. Le misurazioni sono state effettuate automaticamente con un Siemens Viva-E drug testing system (Siemens, Newark, DE).

KIT IMMUNOENZIMATICI

I kit utilizzati sono Screen® 7 (SCREEN ITALIA Srl, Perugia, Italia), InstAlertTM (Biosigma Srl, Venezia, Italia) and SureStepTM (Alere Srl, Milano, Italia) per la matrice urina, e Screen® Multi-Drug OFD (SCREEN ITALIA Srl, Perugia, Italia) e GIMA One Step Multi-Line Screen Test OFD (GIMA Spa, Gessate, Milano, Italia) per la matrice saliva. In ogni caso sono state seguite le istruzioni fornite dal costruttore [**90**-**94**].

I campioni di urina e di saliva vengono raccolti in contenitori puliti e asciutti, ed analizzati a temperatura ambiente (25°C) entro un'ora dalla raccolta della matrice. I kit vengono immersi verticalmente nell'urina fortificata per circa 15 secondi e i risultati vengono letti dopo 7 minuti. I kit per l'analisi della saliva presentano un'estremità spugnosa che viene immersa nella matrice fortificata fino a saturarla completamente, e i risultati vengono letti dopo 10 minuti. L'assenza o la presenza di una linea colorata, anche se molto sbiadita, nella zona "TEST" del kit indica un risultato rispettivamente positivo o negativo; la presenza di una linea colorata nella zona "CONTROLLO" del kit è invece necessaria per considerare validi sia i risultati positivi che quelli negativi (**Figura 15**). Ogni analisi è stata ripetuta in triplicato (n=3).

Figura 15



LC-MS

Per le analisi in LC-MS è stato utilizzato un cromatografo Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) 1100 series (LC-MSD), munito di autocampionatore (G1313A). La separazione cromatografica è stata ottimizzata con una colonna Phenomenex Luna C18 (150 × 2.1 mm i.d., particle size 3 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA), equipaggiata con una precolonna C18 (4 ×2.1 mm i.d., particle size 3 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA).

LC-MS/MS

Per le analisi in LC-MS/MS è stato utilizzato un cromatografo Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)**.** La separazione cromatografica è stata ottimizzata con una colonna Phenomenex Luna C18 (100 × 2.0 mm i.d., particle size 3 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) equipaggiata con una precolonna C18 (4 ×2.1 mm i.d., particle size 3 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA).

ELETTROFORESI CAPILLARE

Le amfetamine chirali oggetto di studio sono state separate tramite elettroforesi capillare, utilizzando un 3DCE (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) interfacciato con un rivelatore DAD 1040A**,**

utilizzando un capillare di silice fusa (50 μm ID) con una lunghezza totale di 40 cm (lunghezza effettiva 31.5 cm), termostatato a 20°C. Il voltaggio è stato impostato a +25 kV e la lunghezza d'onda del rivelatore a 210 nm.

ESPERIMENTI *IN VIVO*

Gli animali utilizzati per le applicazioni *in vivo* dei metodi proposti sono ratti Winstar (Morini) del peso di 200-250 grammi, che vengono mantenuti a temperatura e umidità costanti (24 ±1°C e 60 ± 5%) con un ciclo luce-buio di 12 ore e libero accesso al cibo (Mucedola, Milan, Italy) e all'acqua. Tutte le procedure sono state attuate secondo protocolli standard che tengono conto della Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Bethesda, MD, USA) e sono state approvate dalla Commissione Locale per l'Utilizzo e la Tutela degli Animali.

PARTE CHIMICA

In questo triennio di ricerca, gran parte del lavoro è stata dedicata alla messa a punto di due metodi analitici: uno per la determinazione contemporanea dei quattro analiti target metilendiossi sostituiti (MDCPM, MDIP, MDBZ, MDE), e uno per l'analisi multiresiduo delle amfetamine selezionate appartenenti alla serie BOX (BOB, BOD, BOH, BOHD).

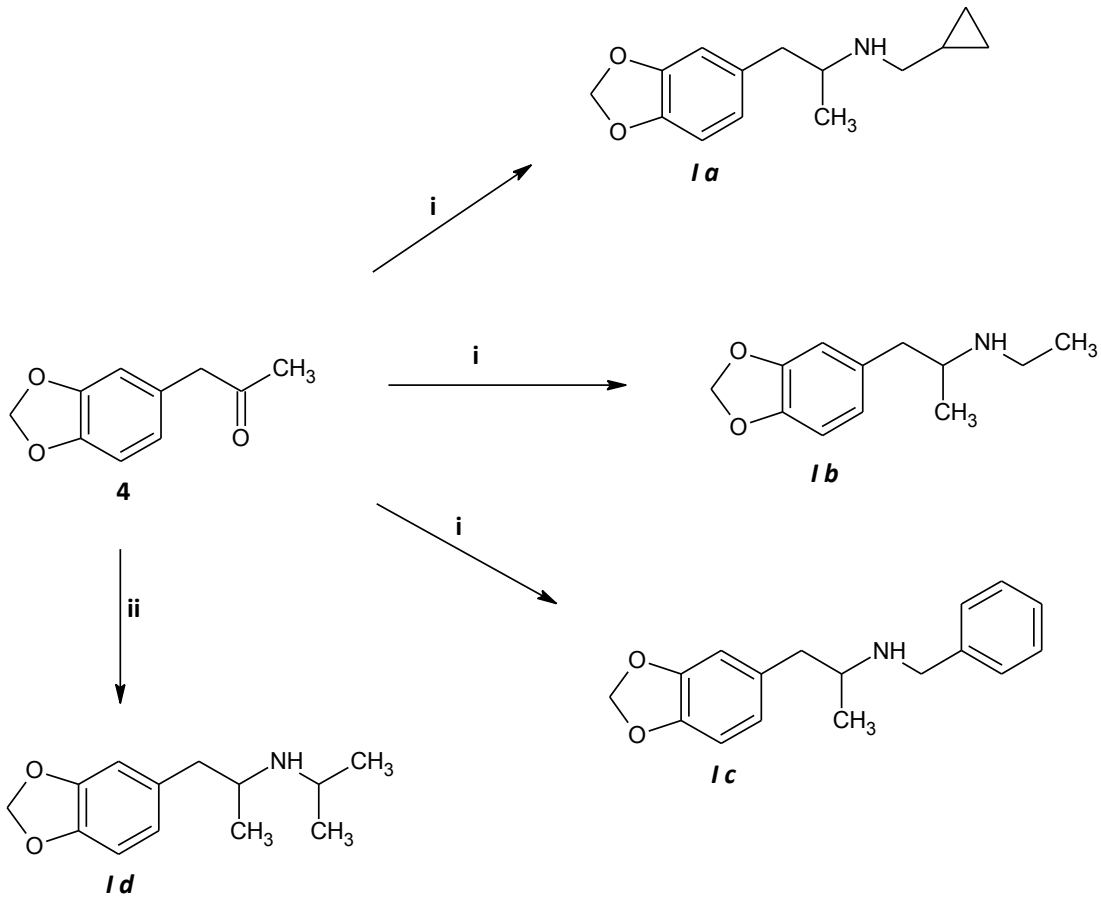
Il primo non facile passo per la progettazione di un'analisi chimico-tossicologica multiresiduo è quello di avere a disposizione gli standard delle molecole che debbono essere sottoposte a questo tipo di determinazione. Infatti è possibile trovare sul mercato solamente le molecole che sono inserite nelle tabelle del Ministero della Salute come sostanze stupefacenti e psicotrope. Pertanto la prima fase del lavoro è stata quella di sintetizzare gli standard delle otto amfetamine prescelte. Per garantire una maggiore attendibilità dei risultati analitici inoltre, è stato utilizzato uno standard interno (IS) rappresentato da una molecola deuterata. A questo proposito è stata sintetizzata la 2,3-dimetossifeniletilamina-d_3 (2,3-DMPEA-d_3). Successivamente è stata progettata e sperimentata la più idonea procedura estrattiva degli analiti dalla matrice. Infine sono state studiate e validate le condizioni ottimali per l'analisi multiresiduo degli analiti, scegliendo la cromatografia liquida accoppiata a spettrometro di massa come tecnica di elezione [**95**]**.**

SINTESI MDAs

La sintesi delle amfetamine ***I a-d*** è stata effettuata secondo lo **Schema 1**, a partire dal 3,4-metilendiossifenilacetone (**4**), il quale viene sottoposto a reazione di amminazione riduttiva nel caso dei composti ***I a-c*** con complesso pirida-borano su setacci molecolari in metanolo anidro [**96**], e con sodiocianoboroidruro in metanolo nel caso del composto ***I d*** [**89**].

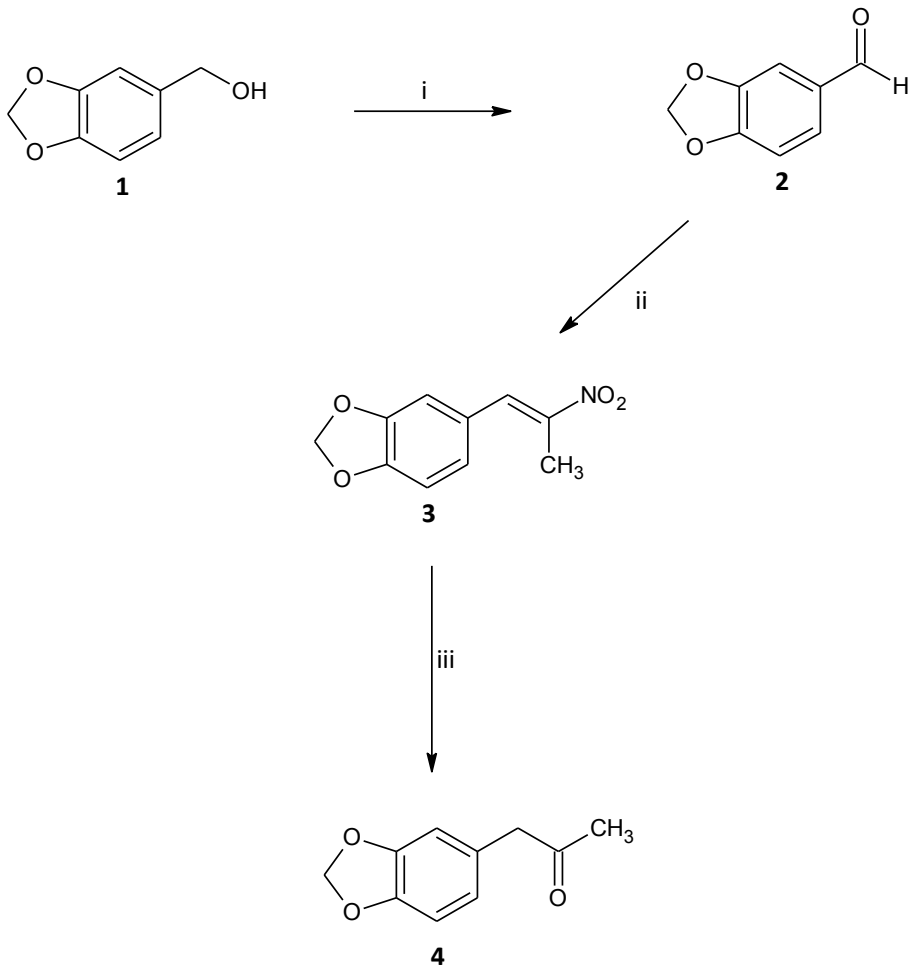
L'intermedio **4** è stato sintetizzato secondo lo **Schema 2** a partire dal piperonil alcol (**1**), disponibile commercialmente, che è stato fatto reagire con diclorometano e ossido di manganese [**97**] per dare l'aldeide **2**, la quale, per trattamento con nitroetano e acetato d'ammonio anidro ha fornito il nitrostirene **3**, che per reazione con ferro e acido acetico glaciale ha fornito in buone rese il chetone **4**.

Schema 1



Reagenti e condizioni: (i) complesso piridina borano, CH_3OH anidro; (ii) $NaBH_3CN$, CH_3OH, HCl

Schema 2



Reagenti e condizioni: (i) CH_2Cl_2, MnO_2; (ii) $CH_3CH_2NO_2$, CH_3COONH_4 anidro; (iii) Fe, CH3COOH glaciale

SINTESI BOX

La sintesi delle feniletilamine ***I e-h*** è stata effettuata come descritto **nello Schema 3**, seguendo due differenti vie sintetiche (*via a* e *via b*).

Via sintetica a

I derivati ***I e-g*** sono stati sintetizzati a partire dalle aldeidi **5 e-g** che per trattamento con nitrometano a caldo hanno fornito i corrispondenti nitrostireni **6 e-g**; questi, per trattamento con sodio metilato in metanolo anidro a temperatura ambiente hanno portato all'ottenimento dei derivati **7 e-g** che per riduzione con Zn in acido acetico glaciale e HCl concentrato hanno fornito le desiderate amine ***I e-g*****.**

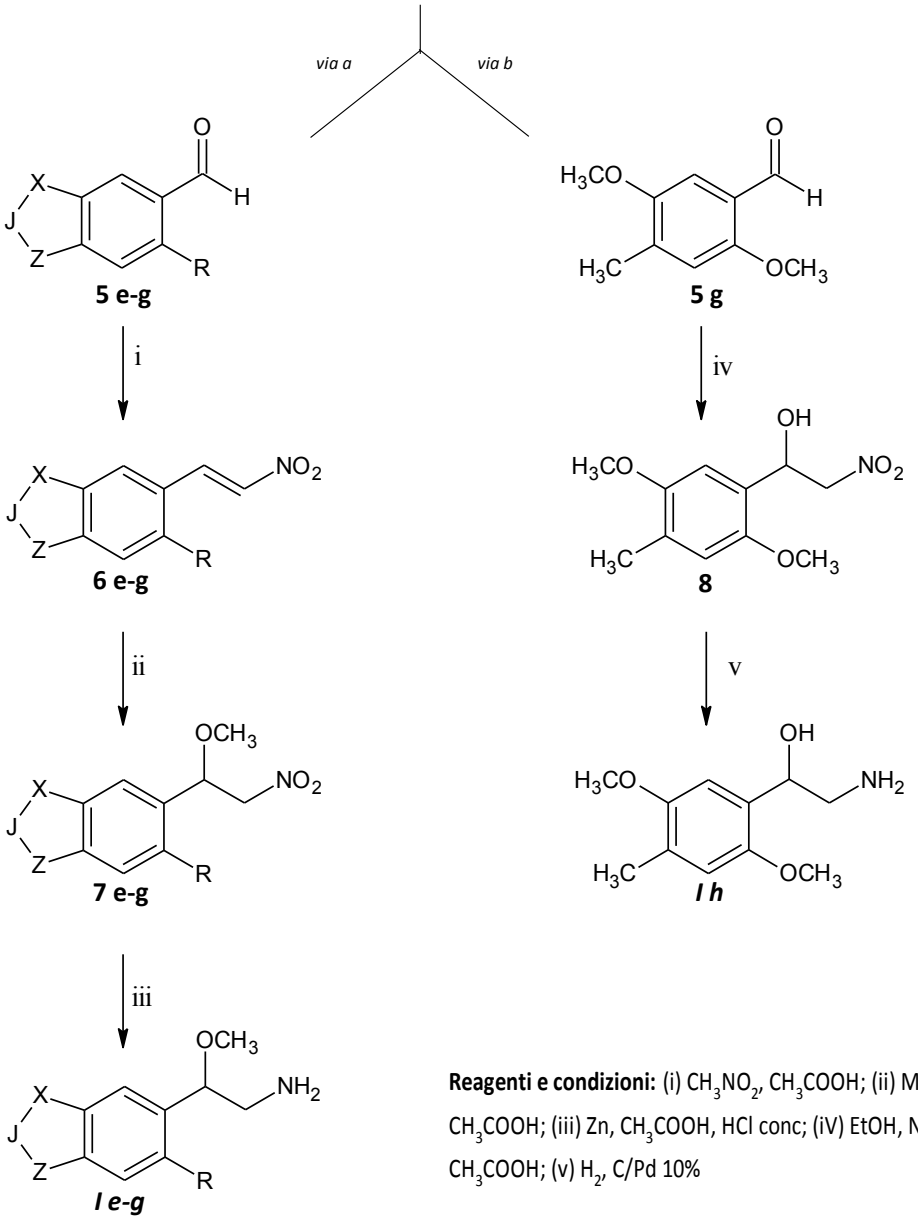
Via sintetica b

La feniletilammina ***I h*** è stata preparata seguendo una metodica descritta in letteratura [**98**] a partire dalla aldeide **5 g** che per trattamento con nitrometano e sodio idrossido in etanolo ha dato il derivato **8** il quale è stato ridotto con idrogeno su carbone palladiato al 10% dando la desiderata feniletilammina ***I h*****.**

Sintesi dell'aldeide **5 g**

L'aldeide **5 g**, non essendo disponibile in commercio, è stata sintetizzata secondo lo **Schema 4** a partire dal 2-metilidrochinone **9** che è stato alchilato con sodio idrossido e dimetilsolfato a dimetossiderivato **10**, il quale, per trattamento con *N*-metilformanilide, ha fornito l'attesa aldeide **5 g**.

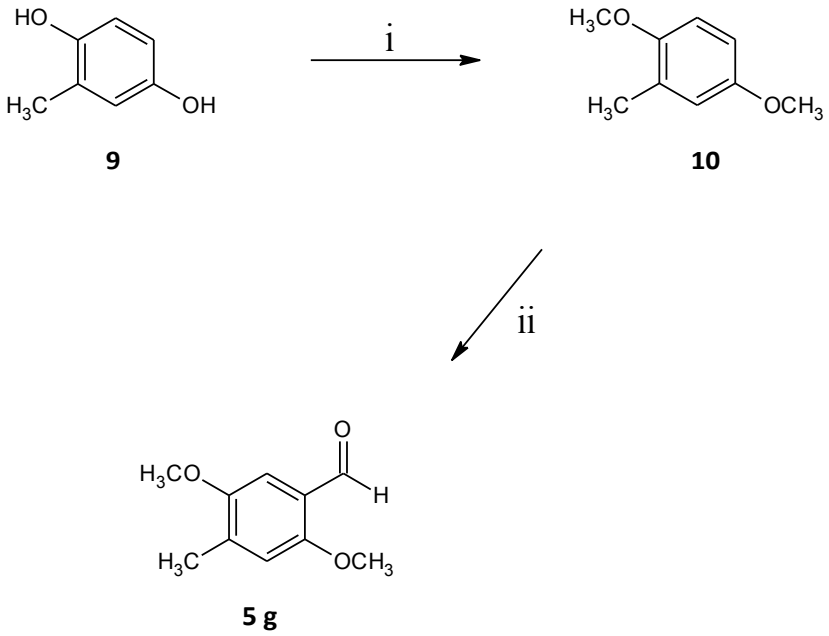
Schema 3



I	R	X	J	Z
e	-OCH3	-OCH3	-	-Br
f	-H	-O-	-CH2-	-O-
g	-OCH3	-OCH3	-	-CH3

Schema 4

Sintesi dell'aldeide 5 g



9 **10** **5 g**

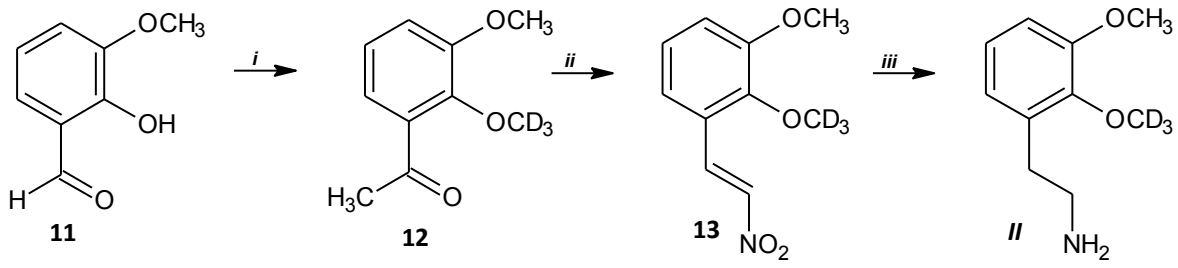
Reagenti e condizioni: (i) NaOH 25%, dimetilsolfato, T amb.; (ii)$POCl_3$, N-dimetil formanilide, 100°C.

SINTESI DELLO STANDARD INTERNO (2,3-DMPEA-d_3)

Lo standard interno deuterato ***II*** è stato sintetizzato secondo le **Schema 5** a partire dall'orto-vanillina **11**, disponibile commercialmente, che è stata alchilata con iodometano-d_3 in ambiente basico, dando l'intermedio **12** che, in seguito a trattamento con nitrometano a riflusso ha dato il nitrostirene **13**. La riduzione di **13** con sodioboroidruro e trifluoroboroeterato di etile in tetraidrofurano anidro e i successivi passaggi di purificazione hanno permesso di isolare l'attesa ammina ***III***.

Schema 5

Sintesi della 2,3-dimetossifeniletilamina-d_3 (IS)

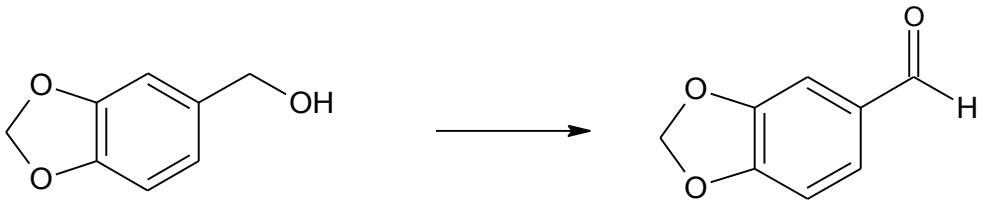


Reagenti e condizioni: (i) CD_3I, KOH, DMSO; (*ii*) CH_3NO_2, CH_3COONH_4; (iii) $NaBH_4$, BF_3-Et_2O, THF anidro

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DELLE MDAs

SINTESI DEL 3,4-METILENDIOSSIFENILACETONE

Piperonale (2)



Ad una soluzione di 5 g (32.8 mmol) di **1** in circa 20 ml di diclorometano si addizionano 28.7 g (330 mmol) di ossido di manganese. Si lascia reagire sotto costante agitazione per 24 ore a temperatura ambiente. Si filtra, quindi si allontana il solvente in evaporatore rotante. Il prodotto si presenta sotto forma di cristalli bianco sporco.

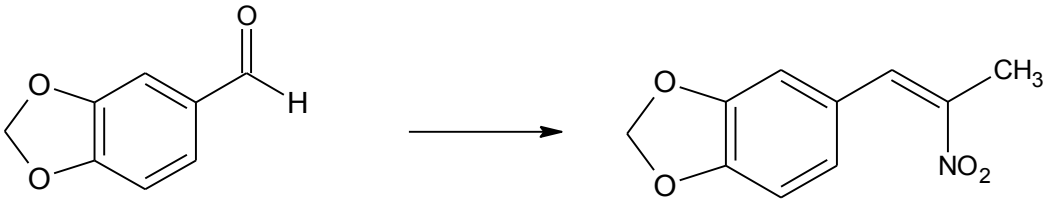
Resa: 80%

Rf: 0.45 (etere di petrolio/acetato di etile 90/10)

Pf: 36 - 37 °C

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$) δ: 9.82 (s, 1H, H-C=O); 7.44-7.35 (m, 2H, arom); 6.96-6.92 (d, 1H, arom); 6.09 (s, 2H, O-CH_2-O)

3,4-metilendiossifenil-2-nitrostirene (3)



5 g (33.3 mmol) di **2** in 13.3 ml (186 mmol) di nitroetano e 0.5 g (3.33 mmol) di acetato di ammonio anidro vengono riscaldati a 100°C; si lascia reagire sotto costante agitazione per 24 ore. Al termine si evapora il solvente, il residuo si raffredda con acqua, si lava con alcol isopropilico e si filtra, ottenendo il prodotto **3**, che si presenta sottoforma di solido giallo.

Resa: 57 %

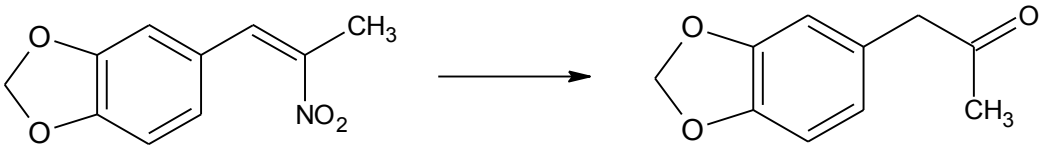
Rf: 0.56 (etere di petrolio/acetato di etile 90/10)

0.69 (etere di petrolio/acetato di etile 80/20)

Pf: 96 - 97.2 °C

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 8.02 (s, 1H, CH); 7.00-6.87 (m, 3H, arom); 6.05 (s, 2H, O-CH_2-O); 2.46 (s, 3H, CH_3)

3,4-metilendiossifenilacetone (4)



Una sospensione di 6.4 g di limatura di ferro in 30 ml di acido acetico glaciale viene riscaldata a 100°C. Si addiziona quindi una soluzione di 2 g (9.6 mmol) di **3** in 16 ml di acido acetico glaciale. Dopo 4 ore la miscela di reazione viene versata in 400 ml di acqua, filtrata ed estratta con diclorometano; le frazioni organiche riunite vengono lavate con una soluzione acquosa diluita di idrossido di sodio e quindi con acqua. L'evaporazione del solvente, previo essiccamento su solfato di sodio anidro, ha fornito un grezzo che è stato purificato via flash cromatografia, utilizzando come fase mobile etere di petrolio/acetato di etile 90/10, il che ha permesso di ottenere l'atteso prodotto **4** sotto forma di olio giallo.

Resa: 87 %

Rf: 0.27 (etere di petrolio/acetato di etile 90/10)

0.49 (etere di petrolio/acetato di etile 80/20)

Pf: olio

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.79-6.62 (m, 3H, arom); 5.95 (s, 2H, O-CH_2-O); 3.60 (s, 2H, CH_2-C=O); 2.15 (s, 3H, CH_3-C=O)

METODO GENERALE DI SINTESI DELLE AMFETAMINE I a-c.

A 15 ml di metanolo anidro vengono addizionati 0.40 g di setacci molecolare in polvere dal diametro interno di 4 Å, precedentemente attivati in muffola per 48 ore. Si aggiungono quindi 2.8 mmoli di **4**, 2.8 mmol di ammina cloridrata e 0.35 ml di complesso piridina borano.

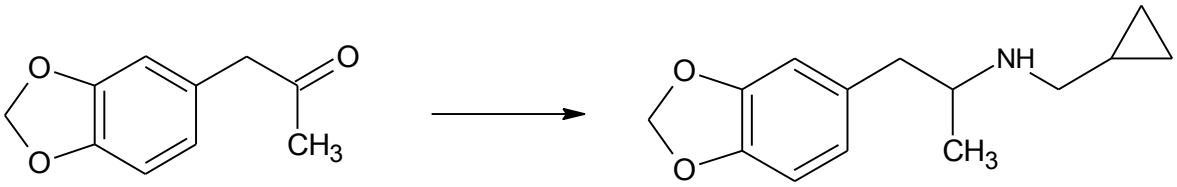
La miscela viene mantenuta a temperatura ambiente per 70 ore; si scalda quindi a 60°C per 24 ore.

Si raffredda la miscela, si addizionano goccia a goccia 6 ml di acido cloridrico 6 N e si lascia reagire per altre 2.5 ore a temperatura ambiente.

Si alcalinizza quindi con sodio idrossido 8 N, si filtra e si estrae con diclorometano. Gli estratti organici, riuniti, vengono seccati su sodio solfato anidro e evaporati e secco, dando le attese ammine ***I a*-c**, purificate via flash cromatografia (fase mobile: cloroformio/metanolo 95/5).

3,4-metilendiossi-*N*-ciclopropilmetilamfetamina (*I a*)

MDCPM



Resa: 61%

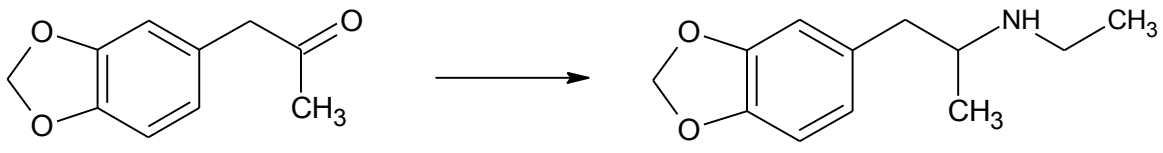
Rf: 0.18 (cloroformio/metanolo 95/5)

Pf: 105.8 - 107.6 °C

^{1}H-NMR ($CDCl_3$ + D_2O) δ: 6.76-6.62 (m, 3H, arom); 5.93 (s, 2H, O-CH_2-O); 3.00-2.81 (m, 1H, CH); 2.80-2.35 (m, 4H, 2 x CH_2); 2.01 (s, 1H, NH scambia con D_2O); 1.09-1.06 (d, 3H, CH_3); 0.99-0.82 (m, 1H, CH); 0.5-0.45 (m, 2H, CH_2); 0.18-0.13 (m, 2H, CH_2)

3,4-metilendiossi-*N*-etilamfetamina (*I b*)

(MDE)



Resa: 63%

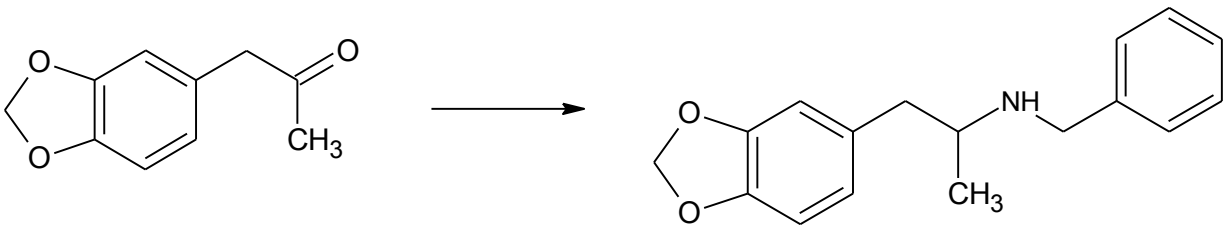
Rf: 0.11 (cloroformio/metanolo 95/5)

Pf: 69.8 - 72.6 °C

^{1}H-NMR ($CDCl_3$ + D_2O) δ: 7.53 (s, 1H, NH scambia con D_2O); 6.76-6.62 (m, 3H, arom); 5.93 (s, 2H, O-CH_2-O); 3.17-3.12 (d, 2Hm CH_2); 3.04-2.90 (q, 2H, CH_2-CH_2-CH_3); 2.66-2.54 (m, 1H, CH); 1.33-1.26 (m, 3H, CH_2-CH_3); 1.21-1.18 (d, 2H, CH-CH_3)

3,4-metilendiossi-*N*-benzilamfetamina (*I c*)

(MDBZ)



Resa: 37%

Rf: 0.40 (cloroformio/metanolo 95/5)

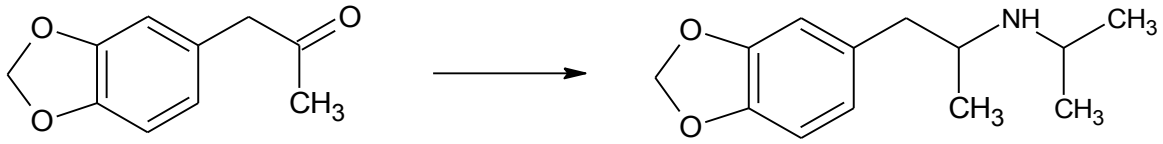
Pf: 72 - 78 °C

^{1}H-NMR ($CDCl_3$ + D_2O) δ: 7.31-6.49 (m, 8H, arom); 5.93 (s, 2H, O-CH_2-O); 3.95-3.05 (m, 1H, CH); 2.96-2.43 (m, 4H, 2 x CH_2); 1.93 (s, 1H, NH scambia con D_2O); 1.12-1.06 (d, 3H, CH_3)

SINTESI DELLA AMFETAMINA I d

3,4-metilendiossi-N-isopropilamfetamina

(MDIP)



Ad una soluzione di 6.3 ml (73.3 mmol) di isopropilamina in 30 ml di metanolo vengono addizionati 1.39 g (7.8 mmol) di **4** seguiti da una miscela di acido cloridrico al 37% e metanolo (1:1) fino al raggiungimento di un pH apparente di 4. Si addizionano quindi 1.2 g (19.1 mmol) di sodio cianoboroidruro e il pH apparente viene riportato a 4. Si fa reagire sotto costante agitazione e a temperatura ambiente per 30 ore. Al termine la miscela viene portata a pH apparente 1 con acido cloridrico 6 N e lavata con diclorometano.

La fase acquosa viene alcalinizzata con sodio idrossido al 25% e quindi estratta con diclorometano; gli estratti organici riuniti si lavano con acqua, si seccano su sodio solfato anidro e

si evaporano a secco, fornendo un olio bianco che tende a solidificare spontaneamente, pur rimanendo di consistenza cerosa.

Resa: 20%

Rf: 0.14 (cloroformio/metanolo 95/5)

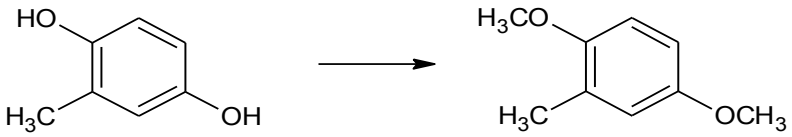
Pf: 33 - 35 °C

^{1}H-NMR ($CDCl_3$ + D_2O) δ: 6.76-6.59 (m, 3H, arom); 5.94 (s, 2H, O-CH_2-O); 3.00-2.85 (m, 2H, 2 x CH); 2.75-2.40 (m, 2H, CH_2); 1.60 (s, 1H, NH scambia con D_2O); 1.07-1.03 (d, 3H, CH_3): 0.95-0.93 (d, 6H, 2 x CH_3)

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DELLE BOX

SINTESI DELL'ALDEIDE 5 g

1,4-dimetossi-2-metilbenzene (10)



Ad una soluzione di 0.5 g (4 mmol) di **9** in 8 ml di acqua si addizionano 1.3 ml di sodio idrossido al 25% e di 0.75 ml di dimetilsolfato (8 mmol). La miscela di reazione, mantenuta a temperatura ambiente per 2.5 ore, viene quindi addizionata di ulteriori 0.35 ml di sodio idrossido al 25% e lasciata sotto agitazione. Dopo 24 ore viene versata in 20 ml di acqua, estratta con diclorometano, seccata su sodio solfato anidro ed evaporata a secchezza ottenendo un olio scuro.

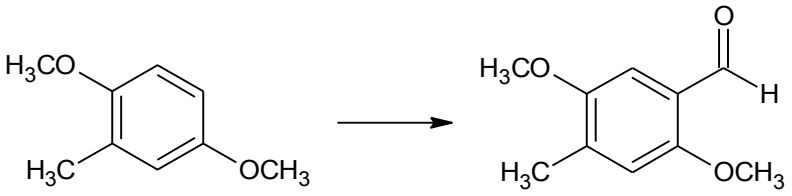
Resa: 60%

Pf: olio

Rf: 0.82 (etere di petrolio/acetato di etile 80/20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.80-6.62 (m, 3H, arom); 3.78 (s, 3H, OCH_3); 3.75 (s, 3H, OCH_3); 2.21 (s, 3H, CH_3)

2,5-dimetossi-4-metilbenzaldeide (5 g)



Una miscela di 0.57 g (3.7 mmol) di ossicloruro di fosforo e 0.5 g (3.7 mmol) di *N*-metilformanilide viene riscaldata per 10 minuti a 100°C, quindi vengono aggiunti 0.15 g (1 mmol) di **10**. Il riscaldamento viene prolungato per 2.5 ore. La miscela di reazione viene versata in 20 ml di acqua calda e lasciata in agitazione per tutta la notte. Il prodotto, filtrato e purificato mediante flash cromatografia (fase mobile: etere di petrolio/acetato di etile 80/20), ha portato all'aldeide **5 g** che si presenta sotto forma solido cristallino biancastro.

Resa: 72 %

Pf: 85 - 86 °C

R_f: 0.42 (etere di petrolio/acetato di etile 80/20)

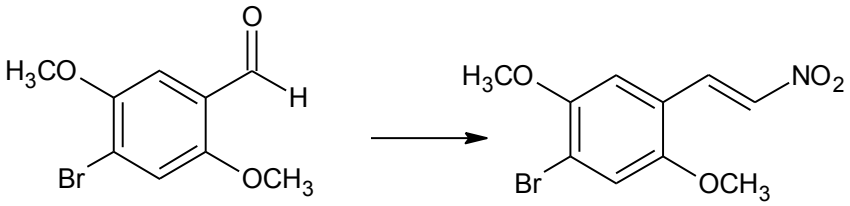
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 10.40 (s, 1H, H-C=O); 7.25 (s, 1H, arom); 6.81 (s, 1H, arom); 3.89 (s, 3H, OCH_3); 3.83 (s, 3H, OCH_3); 2.28 (s, 3H, CH_3)

VIA SINTETICA a

METODO GENERALE DI SINTESI PER I PRODOTTI I e-g

Ad una soluzione di 3.01 mmol delle aldeidi **5 e-g** in 1.5 ml di nitrometano vengono addizionate 0.70 mmol di acetato d'ammonio anidro. La miscela di reazione viene scaldata a 100 °C per 2.5 ore; dopo evaporazione del solvente e successiva cristallizzazione da alcol isopropilico si ottengono i desiderati prodotti **6 e-g**, sotto forma di solidi color giallo o arancio.

2-(2,5-dimetossi-4-bromofenil)-1-nitroetene (6 e)



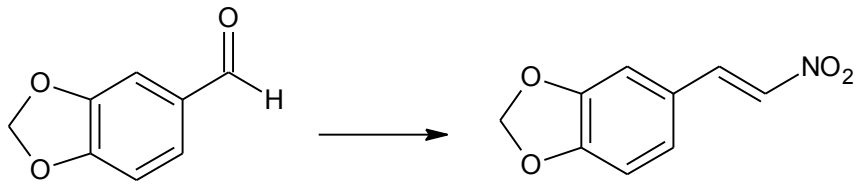
Resa: 80%

Pf: 119 - 122 °C

Rf: 0.66 (etere di petrolio/acetato di etile 80/20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 8.13 (d, 1H, =CH); 7.85 (d, 1H, =CH); 7.07 (s, 1H, arom); 6.82 (s, 1H, arom); 3.91 (s, 3H, OCH_3); 3.80 (s, 3H, OCH_3)

2-(3,4-metilendiossifenil)-1-nitroetene (6 f)



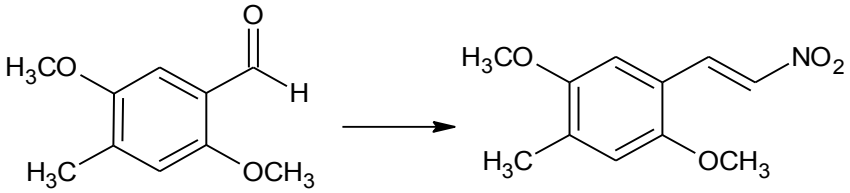
Resa: 72%

Pf: 165 - 166 °C

Rf: 0.58 (etere di petrolio/acetato di etile 80/20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.93 (d, 1H, =CH); 7.47 (d, 1H, =CH); 7.15-6.85 (m, 3H, arom.); 6.07 (s, 2H, CH_2)

2-(2,5-dimetossi-4-metilfenil)-1-nitroetene (6 g)



Resa: 84%

Pf: 119 - 121 °C

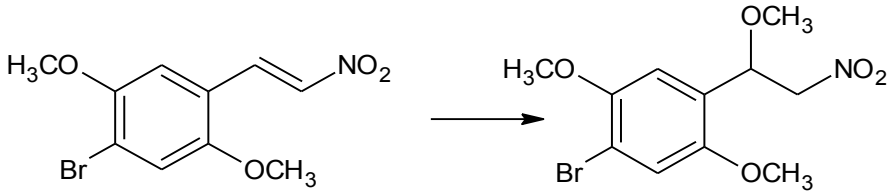
Rf: 0.76 (etere di petrolio/acetato di etile 80/20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 8.14 (d, 1H, =CH); 7.85 (d, 1H, =CH); 6.84 (s, 1H, arom); 6.80 (s, 1H, arom); 3.90 (s, 3H, OCH_3); 3.82 (s, 3H, OCH_3); 2.28 (s, 3H, CH_3)

METODO GENERALE DI SINTESI DEI DERIVATI 7 e-g

Ad una sospensione dei nitrostireni **6 e-g** (2 mmoli) in 2.5 ml di metanolo anidro, viene addizionata una soluzione al 6% di sodio metossilato in metanolo anidro. La miscela viene lasciata in agitazione per 1 ora, quindi vengono aggiunti 1.25 ml di acido acetico glaciale. Dopo qualche minuto alla miscela si aggiungono lentamente 10 ml di acqua e si lascia in agitazione per mezz'ora. Il prodotto viene estratto con diclorometano, gli estratti riuniti vengono lavati con una soluzione satura di sodio bicarbonato, quindi con acqua ed infine evaporati a secco per dare i derivati **7 e-g.**

2-(2,5-dimetossi-4-bromofenil)-2-metossi-1-nitroetano (7 e)



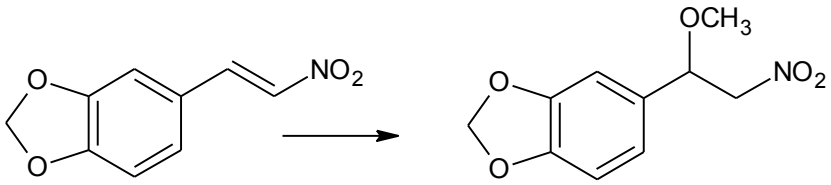
Resa: 76%

Pf: 37 - 44 °C

Rf: 0.61 (cloroformio/metanolo 80/20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.70 (s, 1H, arom); 6.84 (s, 1H, arom); 5.30 (dd, 1H, CH); 4.60-4.32 (m, 2H, CH_2); 3.83 (s, 3H, OCH_3); 3.73 (s, 3H, OCH_3); 3.35 (s, 3H, OCH_3)

2-(3,4-metilendiossifenil)-2-metossi-1-nitroetano (7 f)



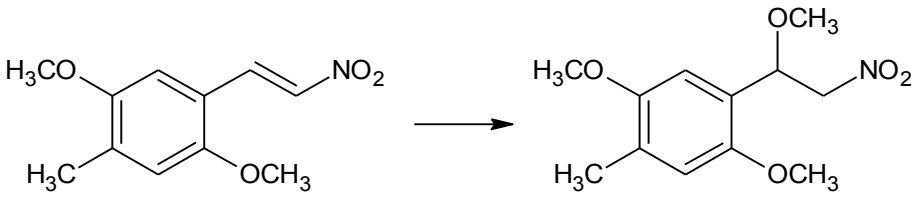
Resa: 71%

Pf: 58 - 61 °C

Rf: 0.35 (etere di petrolio/acetato die tile 80/20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.83-6.70 (m, 3H, arom); 5.99 (s, 2H, CH_2); 4.85 (dd, 1H, CH); 4.57- 4.35 (m, 2H, CH_2); 3.25 (s, 3H, OCH_3)

2-(2,5-dimetossi-4-metilfenil)-2-metossi-1-nitroetano (7 g)



Resa: 84%

Pf: 68 - 71°C

Rf: 0.36 (etere di petrolio/acetato di etile 80/20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 6.89 (s, 1H,arom); 6.73 (s, 1H, arom); 5.33 (dd, 1H, CH); 4.60-4.36 (m, 2H, CH_2); 3.8 (s, 3H, OCH_3); 3.80 (s, 3H, OCH_3); 3.34 (s, 3H, OCH_3); 2.23 (s, 3H, CH_3)

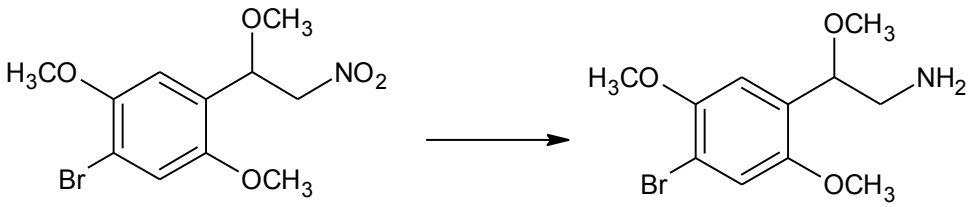
METODO GENERALE DI SINTESI DELLE FENILETILAMINE I e-g

Una soluzione di 1.2 mmoli di **7 e-g** in 2.5 ml di acido acetico viene riscaldata a 100°C. A tale soluzione vengono addizionate 12 mmoli di Zn in polvere e ulteriori 2 ml di acido acetico. Dopo 2.5 ore a 100°C vengono cautamente aggiunti 0.75 ml di acido cloridrico concentrato.

La miscela di reazione viene versata in acqua, estratta con diclorometano e la soluzione acquosa, alcalinizzata con sodio idrossido al 25%, viene, infine, estratta con diclorometano. Gli estratti organici riuniti vengono seccati su sodio solfato anidro, ed stati evaporati a secchezza per dare le attese feniletilamine ***I e-g***.

2-(2,5-dimetossi-4-bromofenil)-2-metossi-1-etilammina (*I e*)

BOB



Resa: 81%

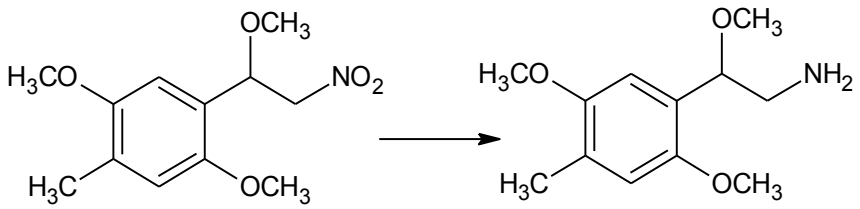
Pf: 87 - 88 °C

Rf: 0.60 (cloroformio/metanolo 80/20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 7.07 (s, 1H, arom); 6.95 (s, 1H, arom); 4.64 (dd, 1H, CH); 3.87 (s, 3H, OCH_3); 3.78 (s, 3H, OCH_3); 3.34 (s, 3H, OCH_3); 2.96-2.76 (m, 2H, CH_2); 3.48 (s, 2H, NH_2 scambia con D_2O)

2-(2,5 dimetossi-4-metilfenil)-2-metossi-1-etilammina (*I f*)

BOD



Resa: 52%

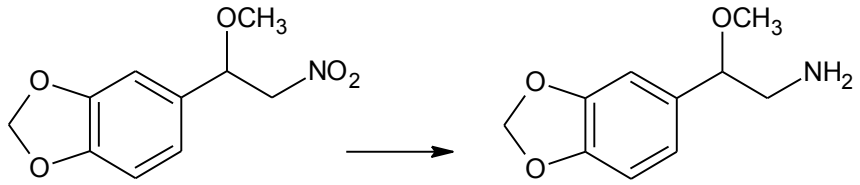
Pf: 94 - 95 °C

Rf: 0.63 (cloroformio/metanolo 80/20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.83 (s, 1H, arom); 6.70 (s, 1H, arom); 4.57 (dd, 1H, CH); 3.80 (s, 3H, OCH_3); 3.77 (s, 3H, OCH_3); 3.31 (s, 3H, OCH_3); 2.90-2.70 (m, 2H, CH_2); 2.24 (s, 3H, CH_3); 1.88 (s, 2H, NH_2, scambia con D_2O)

2-(3,4-metilendiossifenil)-2-metossi-1-etilammina (*I g*)

BOH



Resa: 77%

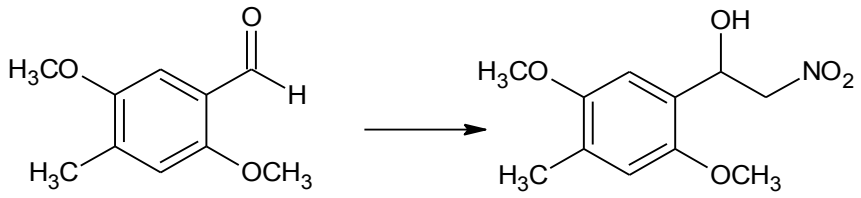
Pf: 139 - 140 °C

Rf: 0.59 (cloroformio/metanolo 80/20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.85-6.71 (m, 3H, arom); 5.95 (s, 2H, CH_2); 4.04 (dd, 1H, CH); 3.25 (s, 3H, OCH_3); 2.92-2.82 (m, 2H, CH_2); 1.66 (s, 2H, NH_2, scambia con D_2O)

VIA SINTETICA b

2-(2,5-dimetossi-4-metilfenil)-2-idrossi-1-nitroetano (8)



Ad una miscela di 0.3 g (1.7 mmol) di **5 g** e 0.18 ml di nitrometano in 17 ml di etanolo viene addizionata una soluzione di 1.6 mmol di sodio idrossido in 1 ml di acqua. La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 15 minuti; viene dunque versata in 0.4 ml di acido acetico e 25 g di ghiaccio tritato e lasciata in agitazione per 1 ora. Si ottengono dei cristalli color arancio che vengono filtrati.

Resa: 40%

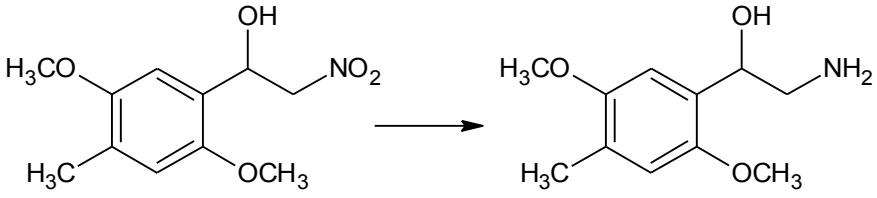
Pf: 88 - 91 °C

Rf: 0.60 (etere di petrolio/acetato di etile 80/20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.83 (s, 1H, arom); 6.70 (s, 1H, arom); 4.57 (dd, 1H, CH); 4.40 (s, 1H, OH, scambia con D_2O); 3.80 (s, 3H, OCH_3); 3.77 (s, 3H, OCH_3); 2.90-2.70 (m, 2H, CH_2); 2.24 (s, 3H, CH_3)

2-(2,5-dimetossi-4-metilfenil)-2-etanolammina (I h)

BOHD



Una miscela di 1.7 g (7 mmol) di **5** in 25 ml di etanolo assoluto e 0.2 g di carbone palladiano al 10% è stata sottoposta ad idrogenazione catalitica con H_2 a 2-3 atmosfere per 2.5 h. La miscela di reazione viene filtrata ed evaporata a secchezza dando la desiderata feniletilammina ***I h*** sotto forma di cristalli bianchi.

Resa: 78%

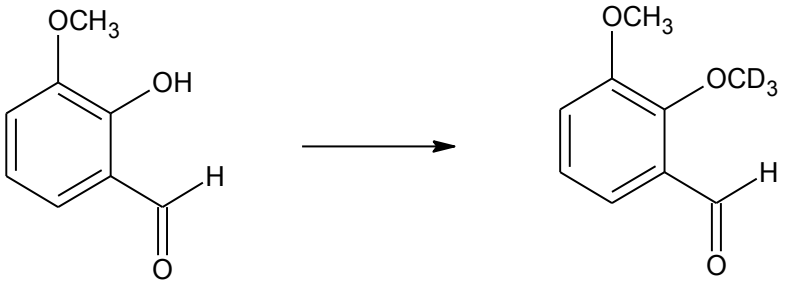
Pf: 97 - 99 °C

Rf: 0.58 (cloroformio/metanolo 80/20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.83 (s, 1H, arom); 6.70 (s, 1H, arom); 4.57 (dd, 1H, CH); 4.40 (s, 1H, OH, scambia con D_2O); 3.80 (s, 3H, OCH_3); 3.77 (s, 3H, OCH_3); 2.90-2.70 (m, 2H, CH_2); 2.24 (s, 3H, CH_3); 1.55 (s, 2H, NH_2, scambia con D_2O)

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DELLO STANDARD INTERNO

2,3-dimetossibenzaldeide-d_3 (12)



Ad una sospensione di 0.77 g (13.6 mmol) di potassio idrossido in 7 ml di dimetilsolfossido si addizionano 0.5 g (3.3 mmol) di **11** e 0.41 ml (6.5 mmol) di ioduro di metile-d_3. Si agita a temperatura ambiente per 2.5 ore e si riprende con abbondante acqua. Si estrae dunque con diclorometano. Le frazioni organiche riunite vengono lavate con acqua e seccate su sodio solfato anidro; il solvente viene dunque evaporato, fornendo il desiderato prodotto sottoforma di olio giallo.

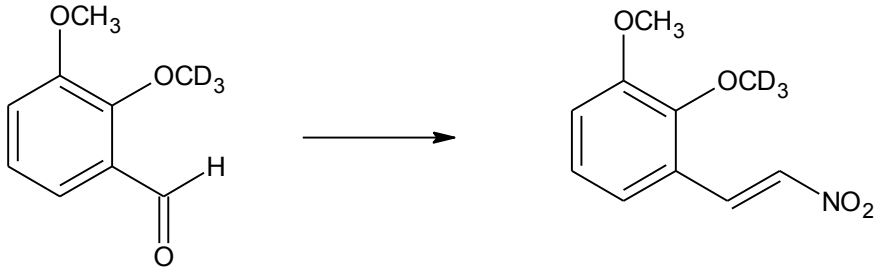
Resa: 96 %

Rf: 0.43 (etere di petrolio/acetato di etile 80/20)

Pf: olio

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 10.44 (s, 1H, H-C=O); 7.45-7.07 (m, 2H, arom); 3.87 (s, 3H, O-CH_3)

1-(2,3-dimetossifenil)-1-nitroetene-d_3 (13)



Ad una soluzione di 0.5 g (3 mmol) di **12** in 1.6 ml (30 mmol) di nitrometano vengono aggiunti 0.13 g (1.7 mmol) di ammonio acetato anidro; la soluzione viene scaldata a 100°C per 2 ore. Dopo raffreddamento si ottiene un grezzo che viene purificato via flash cromatografia utilizzando come

fase mobile etere di petrolio/acetato di etile in rapporto 80/20, il che permette di ottenere il desiderato nitro stirene **13**.

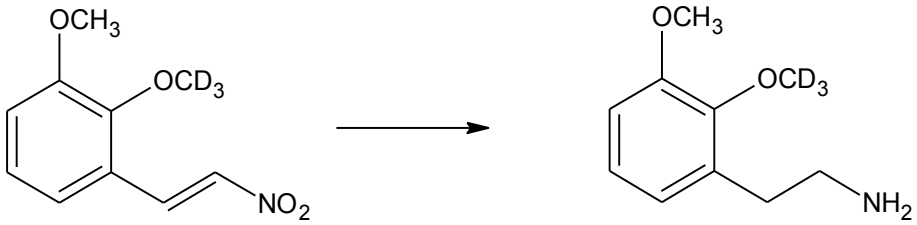
Resa: 67 %

Rf: 0.51 (etere di petrolio/acetato di etile 80/20)

Pf: 83 - 85 °C

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 8.24-8.17 (d, 1H, CH=); 7.80-7.73 (d, 1H, CH=); 7.26-7.06 (m, 2H, arom); 3.90 (s, 3H, OCH_3)

2,3-dimetossifeniletilamina-*d*$_3$ (*II*)
(2,3-DMPEA-*d*$_3$)



Ad una miscela di 0.35 g (9.4 mmol) di sodio boroidruro in 12 ml di tetraidrofurano anidro a 0°C vengono addizionati 1.45 ml (11.28 mmol) di trifluoroboroeterato di etile. Dopo 15 minuti sotto agitazione a temperatura ambiente si addiziona goccia a goccia una soluzione di 0.4 g (1.88 mmol) di **13** in tetraidrofurano anidro. La sospensione viene fatta refluire per 72 ore e successivamente, dopo raffreddamento, viene cautamente addizionata di 20 ml di acqua fredda. Si acidifica con acido cloridrico 1 N, si lava con etere etilico, si alcalinizza con sodio idrossido 2 N e si estrae con diclorometano. Gli estratti organici riuniti vengono seccati su sodio solfato anidro; l'evaporazione del solvente fornisce il prodotto desiderato ***II*** sotto forma di olio incolore che tende a solidificare, dando un solido bianco.

Resa: 63 %

Rf: 0.16 (cloroformio/metanolo di etile 90/10)

Pf: 83 - 85 °C

^{1}H-NMR ($CDCl_3$ + D_2O) δ: 7.04-7.81 (m, 2H, arom); 3.86 (s, 3H, OCH_3); 2.94-2.91 (t, 2H, CH_2); 2.80-2.77 (t, 2H, CH_2); 1.51 (s, 2H, NH scambia con D_2O)

PARTE ANALITICA

Come detto in precendenza, dal punto di vista chimico-tossicologico l'abuso di derivati amfetaminici può essere messo in evidenza mediante l'identificazione del principio attivo nei fluidi biologici e nei tessuti. In un laboratorio di tossicologia forense le analisi routinarie di screening per l'identificazione di questi derivati nei fluidi biologici si sviluppano con l'utilizzo di kit immunoenzimatici. La "conferma" nel caso di risultati positivi, così come anche la quantificazione della sostanza rinvenuta, necessitano di tecnologie strumentali cromatografiche più sicure ed efficienti (GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS). In particolare, si è deciso di utilizzare la LC-MS per i derivati metilendiossi sostituiti, e la LC-MS/MS per i derivati ossigenati. Il primo passo per la messa a punto del metodo analitico è stato quello di sperimentare le condizioni cromatografiche più idonee per la separazione dei designer drugs oggetto di studio e dello standard interno.

L'utilizzo della tecnica dello standard interno permette di rendere le procedure analitiche a più stadi indipendenti da eventuali errori di diluizione, da variazioni del volume di campione introdotto nello strumento che effettua l'analisi, dal recupero di estrazione o da eventuali perdite di campione durante le varie fasi analitiche. L'indipendenza da tutti questi fattori è dovuta al fatto che, al momento della quantificazione, si opera in base a misure relative, e cioè all'area dell'analita rapportata all'area dello standard interno (addizionato in quantità nota). Gli standard interni ideali sono sostanze deuterate con caratteristiche simili a quelle degli analiti, in quanto vengono estratti, purificati e rivelati nelle stesse condizioni in cui vengono estratti, purificati e rivelati gli analiti stessi. Ciò garantisce una maggiore riproducibilità analitica.

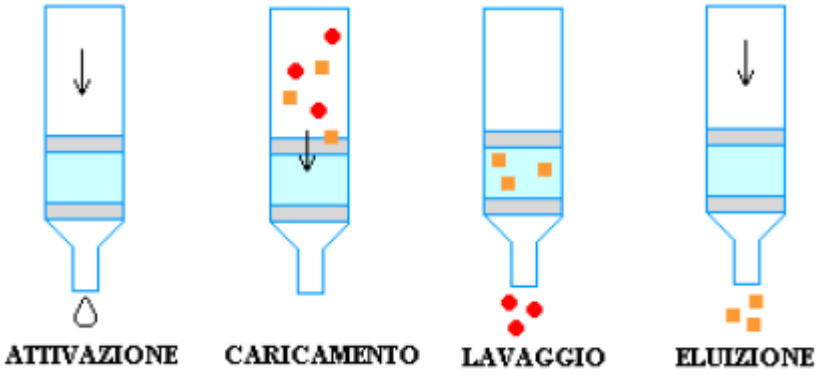
Gli analiti target sono stati estratti da campioni di urina (MDAs) e di plasma (BOX), applicando un metodo precedentemente validato dal gruppo di ricerca [**99**-**104**]. In particolare, l'estrazione selettiva delle amfetamine dalla matrice è stata ottenuta mediante la tecnica dell'estrazione su fase solida (SPE).

Si tratta di una tecnica di interazione per adsorbimento, in cui la fase solida ha un'affinità spiccata per il composto da isolare ma non per il liquido in cui esso è disciolto. Per attuare questa tecnica vengono utilizzate delle colonnine SPE impaccate, appunto, con una fase solida. Quando il campione viene fatto passare attraverso la colonnina interagisce in maniera molto forte con la stessa, mentre le altre sostanze presenti del fluido in esame (presumibilmente una matrice complessa) fluiscono, senza interagire. Questo differente comportamento fa sì che sia possibile separare l'analita dagli interferenti della matrice biologica. Permette inoltre di concentrarlo sulla fase solida, e di ritrovarlo poi in un piccolo volume di solvente di eluizione.

L'adsorbimento tra analita e fase solida si ottiene in seguito a interazioni specifiche tra i gruppi funzionali dell'analita e il substrato della fase solida. Tra gli adsorbenti più utilizzati ci sono quelli silicei, prodotti dalla reazione tra organosilani e silicati attivi. Le proprietà di ritenzione degli adsorbenti silicei dipendono dai gruppi funzionali legati al substrato di silice, alla polarità del substrato e ai silanoli rimasti liberi sulla superficie. C18 è l'adsorbente più utilizzato per le interazioni non polari [**105**]. In **Figura 16** è riportato lo schema dell'estrazione in fase solida.

Figura 16

Schema di estrazione in fase solida (SPE)



VALIDAZIONE DI UN METODO ANALITICO

L'affidabilità dei risultati analitici è una questione di grande importanza in tossicologia forense e clinica, in quanto è un requisito imprescindibile per la corretta interpretazione dei risultati. La validazione di un metodo è pertanto uno step fondamentale e delicato. Questa consiste nella raccolta di una serie di dati sperimentali che hanno lo scopo di dimostrare l'adeguatezza e la sensibilità di suddetto metodo. Ciò significa che il metodo sviluppato per avere validità deve possedere determinati requisiti (chiamati appunto parametri di validazione) che ne attestino la ripetibilità.

Sono stati studiati una serie di parametri: la **selettività**, l'**effetto matrice**, la **linearità,** la **sensibilità,** il **recupero**, la **ripetibilità** e la **stabilità**.

Un metodo è considerato **selettivo** o **specifico** quando è in grado di discriminare la sostanza che si vuole misurare da eventuali interferenti. Per specificità, dunque, si intende la capacità di un metodo di distinguere tra l'analita che si intende misurare e le altre sostanze; tale caratteristica è prevalentemente una funzione della tecnica di misura, ma può variare in base alla classe del composto o della matrice. Un metodo cromatografico si può definire selettivo quando, analizzando un campione di matrice bianca (priva dell'analita), al tempo di ritenzione dell'analita, non si individuano picchi interferenti.

Quando si lavora con matrici biologiche come plasma e urina, si possono avere dei risultati falsati dalla presenza di sostanze endogene (quindi naturalmente presenti nelle matrici stesse) che potrebbero interferire con l'analisi di un determinato analita. Tali sostanze possono coeluire con esso, generare uno ione-frammento isobarico o sopprimerne la ionizzazione con conseguente alterazione della risposta (aumento o diminuzione), provocando quello che viene detto, appunto, **effetto matrice** [**109**-**111**]. Questo fenomeno può compromettere l'affidabilità dei risultati. Eventuali problemi in tal senso si possono individuare analizzando campioni di matrice bianca con il metodo che si intende validare e confrontando l'area del picco di una soluzione standard con l'area del picco di un estratto di matrice, fortificato dopo l'estrazione, alla stessa concentrazione, secondo l'equazione (percentuale di soppressione ionica o enhancement):

$$\text{Effetto matrice (\%)} = \frac{\text{media aree picchi matrice fortificata - media aree picchi soluzioni standard}}{\text{media aree picchi soluzioni standard}} \times 100$$

Altri due parametri molto importanti sono il **limite di determinazione** (**LOD**) e il **limite di quantificazione** (**LOQ**). Il primo indica la quantità minima di analita rilevabile, il secondo la concentrazione minima di analita precisamente quantificabile.

Si calcolano secondo le seguenti equazioni:

$$LOD = 3\ S/N$$

$$LOQ = 10\ S/N$$

dove S è il segnale e N è il rumore di fondo (noise).

Un altro parametro che è necessario considerare è il **recupero**,che è un indice della capacità del metodo di estrarre l'analita dalla matrice interessata. Si calcola su diverse concentrazioni (in genere una bassa, una media e una alta all'interno del range di linearità) effettuando 10 replicati per ogni campione. Si ottiene dal confronto tra l'area del picco di una soluzione standard con l'area del picco di un estratto di matrice, fortificato prima dell'estrazione alla stessa concentrazione, secondo l'equazione:

$$\text{Recupero (\%)} = \frac{\text{media aree picchi matrice fortificata}}{\text{media aree picchi soluzioni standard}} \times 100$$

La **precisione** espressa in termini di **ripetibilità** indica invece la concordanza tra risultati derivanti da analisi relative allo stesso campione o a campioni analoghi, condotte lo stesso giorno, o in giorni diversi (l'analisi viene ripetuta per cinque volte durante lo stesso giorno - ripetibilità intraday - e ogni giorno per cinque giorni consecutivi - ripetibilità interday -). Viene calcolata come **deviazione standard relativa** (RDS) e si calcola secondo la seguente equazione:

$$RSD\ (\%) = \frac{SD}{M} \times 100$$

Dove SD è la deviazione standard ed M è la media dei valori.

La **stabilità**, invece, viene considerata per quel che riguarda le condizioni di conservazione (quindi in genere dopo cicli di congelamento e scongelamento).

ANALISI MULTIRESIDUO MDAs [112]

STRUMENTAZIONE

I derivati metilendiossi sostituiti sono stati analizzati con un Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) 1100 series LC-MS instrument (LC-MSD) equipaggiato con un autocampionatore (G1313A). Il detector di massa utilizzato è un Agilent G1946 (MSD 1100) singolo quadrupolo, equipaggiato con una sorgente a ionizzazione electrospray a pressione ambiente. L'intero sistema è stato calibrato con le procedure consigliate dal produttore.

SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

La scelta della fase stazionaria per separare la serie MDAs è ricaduta su una colonna C18 che lavora in fase inversa. Si tratta di una fase stazionaria molto versatile e relativamente economica. Inoltre, poichè si lavora con matrici complesse (urina), si è scelto di abbinare ad essa una precolonna, la quale, bloccando le impurezze, prolunga la vita media della colonna e garantisce una maggiore riproducibilità.

Condizioni cromatografiche:

- volume di iniezione 10 μl
- flusso 300 μl/min
- colonna Phenomenex Luna C18 (150 x 2.1 mm i.d., particle size 3 μm) equipaggiata con una precolonna Phenomenex C18 (4 x 2.1 mm, particle size 3 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- fase mobile: soluzione di acido formico allo 0.1% in acqua (A); soluzione di acido formico allo 0.1% in acetonitrile (B)
- gradiente: condizioni iniziali, 20% B; 0-10 min, gradiente lineare dal 20 al 30% B; 10-20 min, gradiente lineare dal 30 al 50% B; 20-21 min, passaggio dal 50 al 20% B; 21-25 min, eluizione isocratica al 20% B.

METODO DI ACQUISIZIONE IN SPETTROMETRIA DI MASSA E VALIDAZIONE

Il metodo è stato ottimizzato iniettando una miscela standard degli analiti e dello standard interno alla concentrazione di 0.25 ng/ml (flusso 100 μl/min). Per la determinazione quantitativa è stato attuato un esperimento Selected Ion Monitoring (SIM). Per ogni analita sono stati selezionati due frammenti, il più abbondante per la quantificazione e il meno abbondante per la conferma dell'identità della molecola. Lo ione quantificatore è per ogni composto la molecola protonata [M+1]: *m/z* 208 per MDE, *m/z* 222 per MDIP, *m/z* 234 per MDCPM, *m/z* 270 per MDBZ

e *m/z* 185 per IS. Come ione di conferma è stato invece selezionato quello che deriva dalla deaminazione dello ione molecolare (*m/z* 163 per tutti gli analiti target). Il detector di massa è stato settato come segue: drying gas (azoto) 350°C, 9.0 l/min; nebulizer gas (azoto) 35 Psi; voltaggio del capillare (positive mode) 3000 V; voltaggio di frammentazione 70 V.

Nella **Figura 17** è riportato un cromatogramma di una miscela standard alla concentrazione di 100 ng/ml, che permette di evidenziare l'ottima risoluzione cromatografica del metodo adottato. Nella **Figura 18** sono invece riportati gli spettri di massa dei singoli analiti e dello standard interno.

Figura 17

Cromatogramma delle 4 amfetamine oggetto di studio e dello standard interno in miscela alla concentrazione di 100 ng/ml

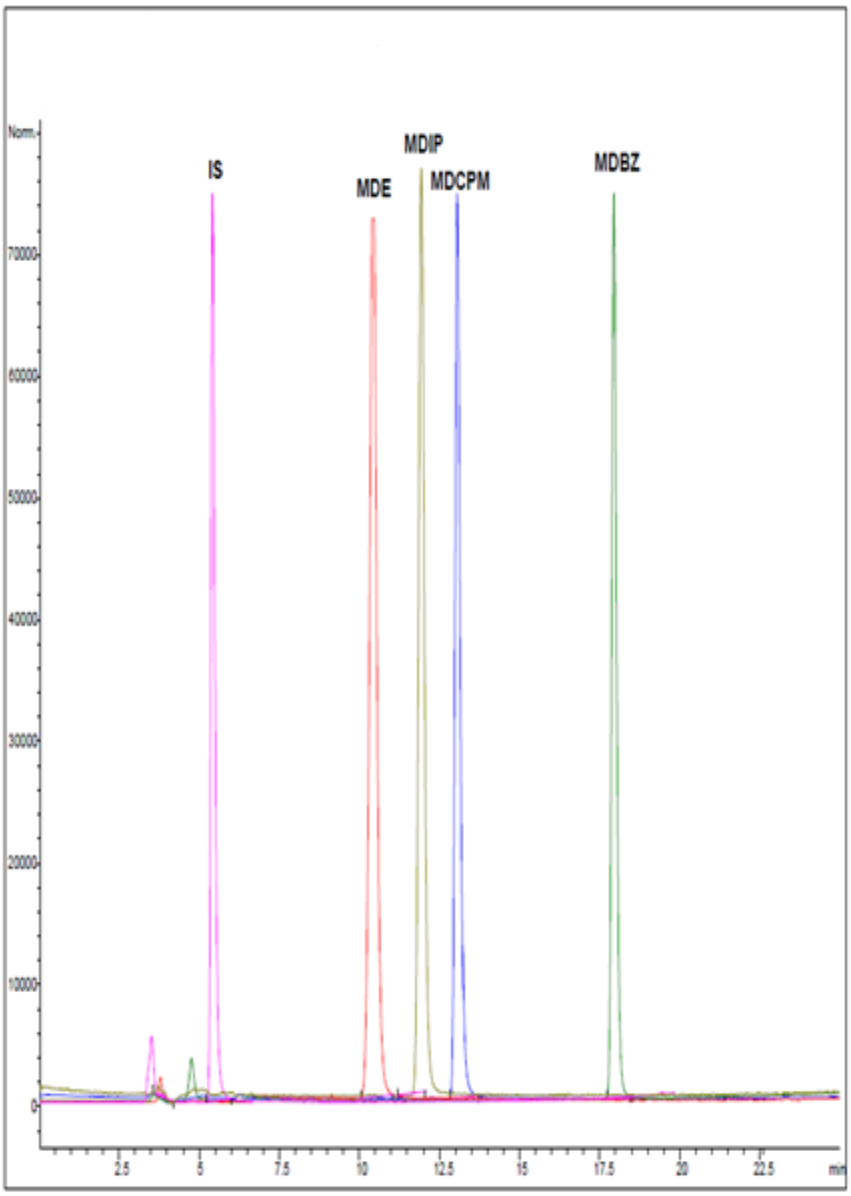
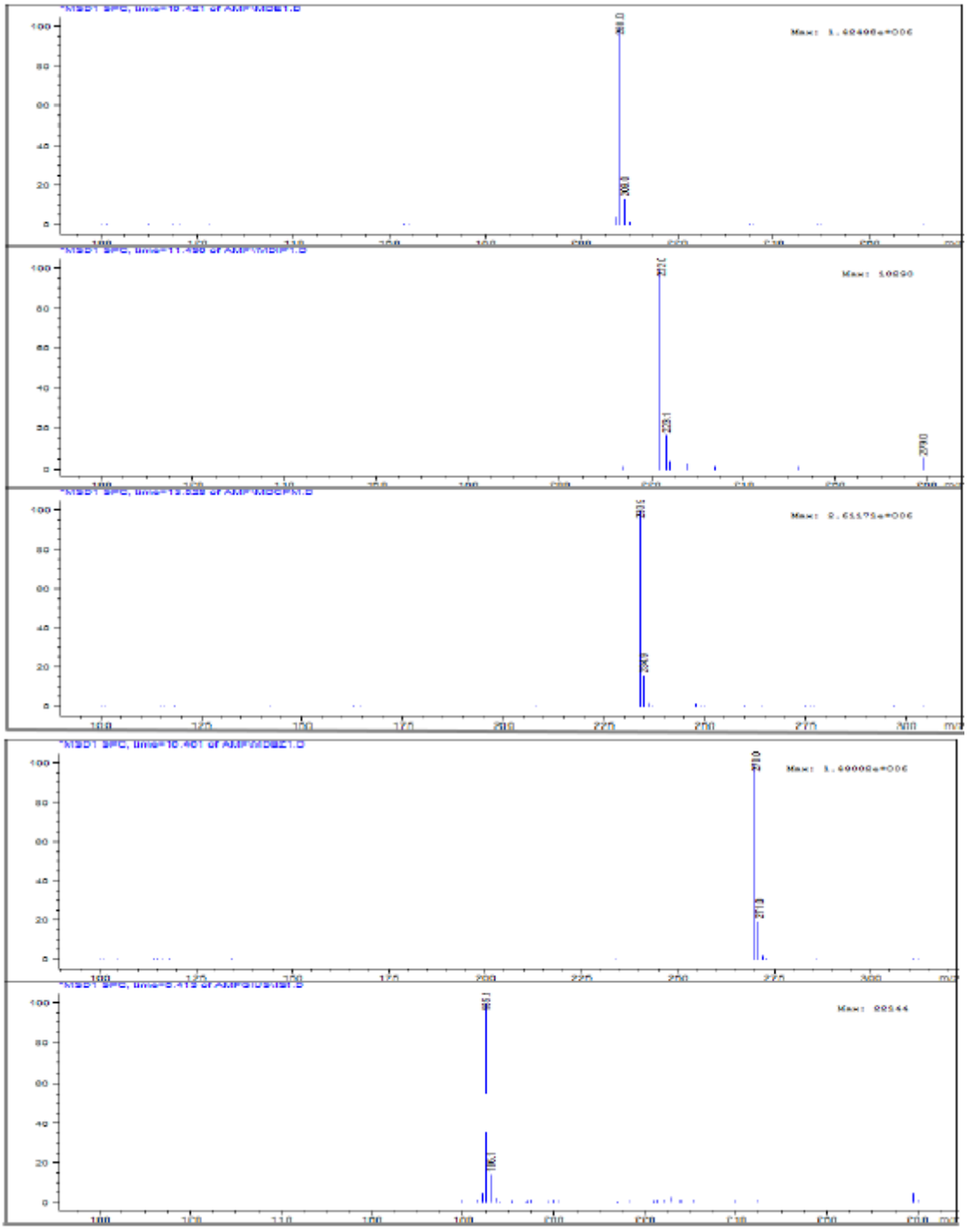


Figura 18

Spettri di massa delle 4 amfetamine oggetto di studio e dello standard interno

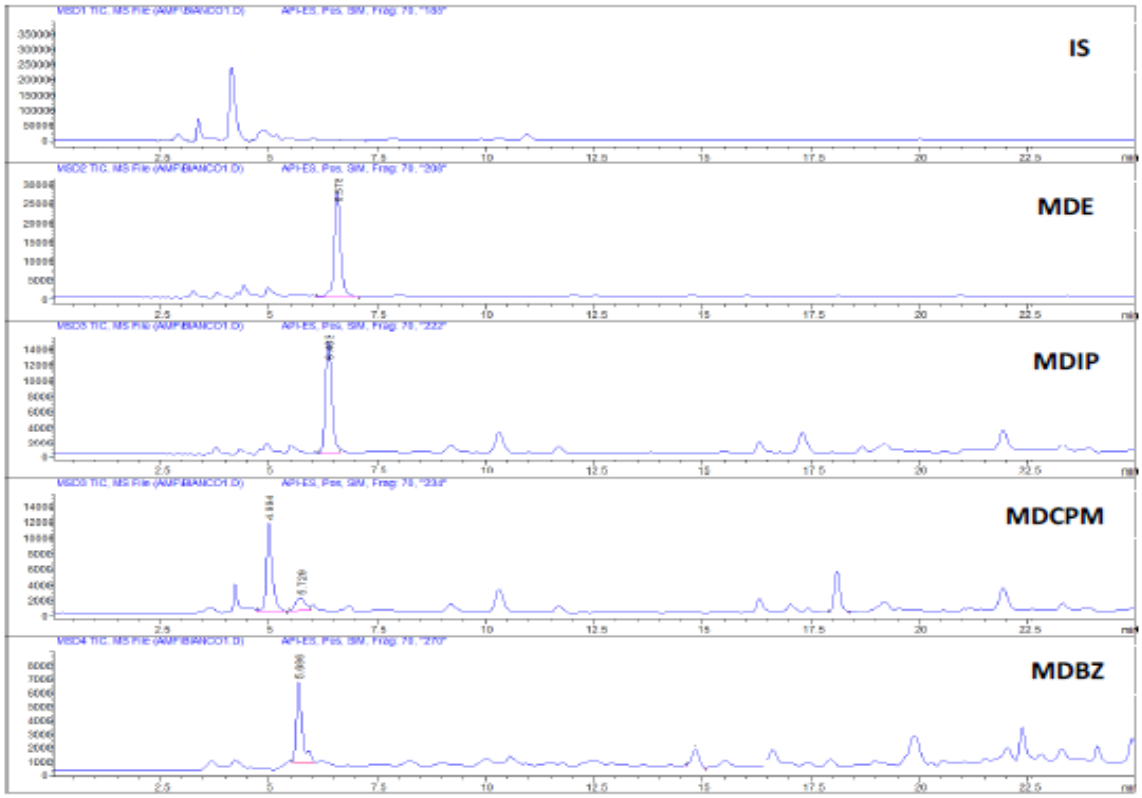


Una volta messo a punto il metodo di separazione e di acquisizione, si è passati all'estrazione degli analiti target dall'urina. La procedura estrattiva sviluppata, semplice e veloce, consiste nel miscelare 1 ml di campione con 1 ml di tampone idrogenofosfato 100 mM a pH 10. Il campione così trattato viene caricato in una colonnina (colonnina SPE Strata C18-E 55 µm 70 A 100 mg/ml, Phenomenex) precedentemente attivata e condizionata con 1 ml di metanolo e 1 ml di tampone idrogenofosfato 100 mM a pH 10. La colonna viene quindi lavata con 2 ml di acqua Milli Q; successivamente gli analiti vengono eluiti con 2 ml di metanolo. La frazione così raccolta viene evaporata a secchezza in corrente d'azoto. Il residuo viene ripreso con 0.1 ml di fase mobile per lo step successivo di analisi.

Nella **Figura 19** sono riportati i cromatogrammi di estratti di urina free registrati ai valori di *m/z* corrispondenti al valore [M+1] di ogni analita.

Figura 19

Cromatogrammi di estratti di urina free registrati ai valori di *m/z* corrispondenti al valore [M+1] di ogni analita



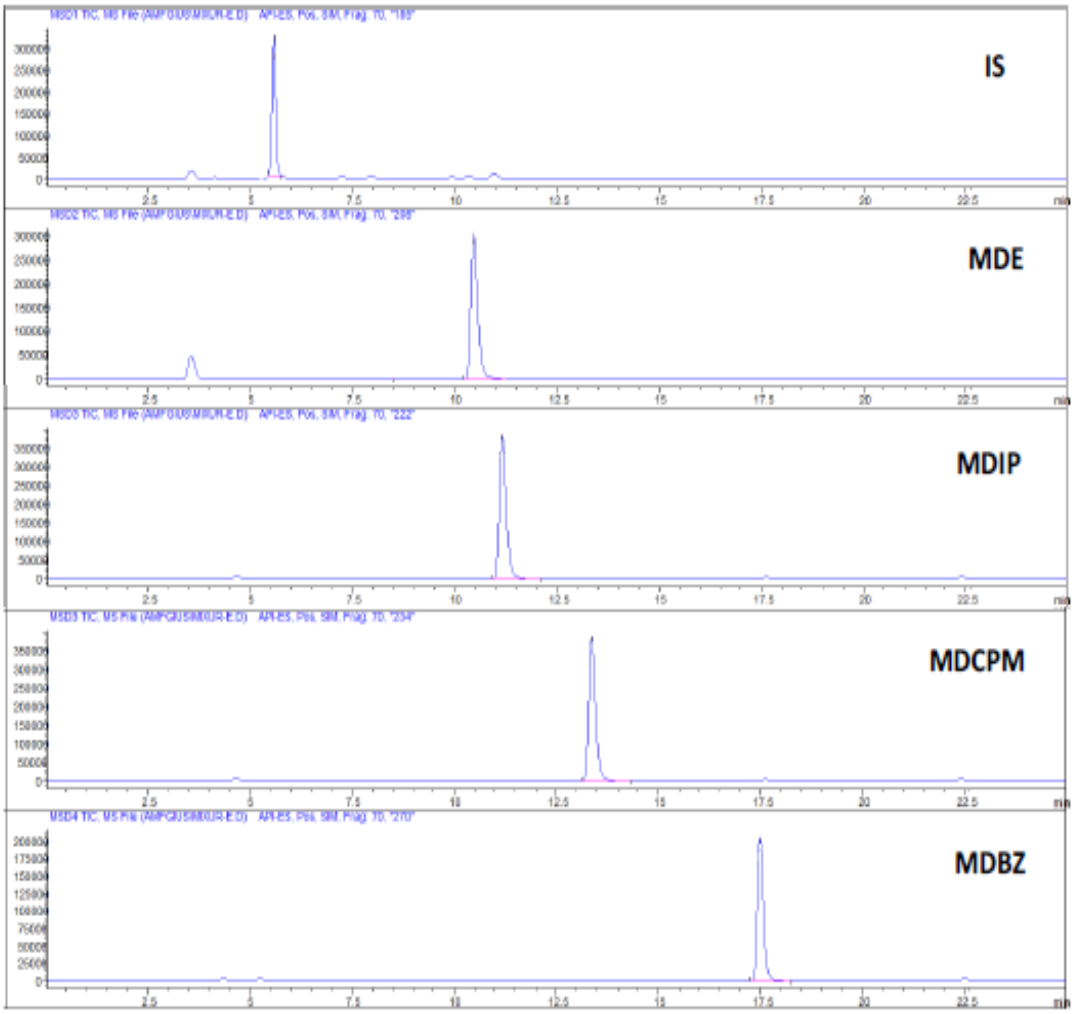
Tale analisi è fondamentale per determinare la **selettività** del metodo proposto: l'analisi di 9 campioni di urina prelevati da 9 ratti diversi ha permesso di verificare l'assenza di interferenti ai

tempi di ritenzione degli analiti. Si ottengono dei cromatogrammi sufficientemente puliti nelle finestre utili per l'identificazione e la quantificazione degli analiti.

Lo stesso metodo è stato dunque applicato a campioni di urina fortificati con una quantità nota di amfetamine. Nella **Figura 20** sono riportati i cromatogrammi di estratti di urina fortificati alla concentrazione di 100 ng/ml.

Figura 20

Cromatogrammi di estratti di urina fortificati alla concentrazione di 100 ng/ml

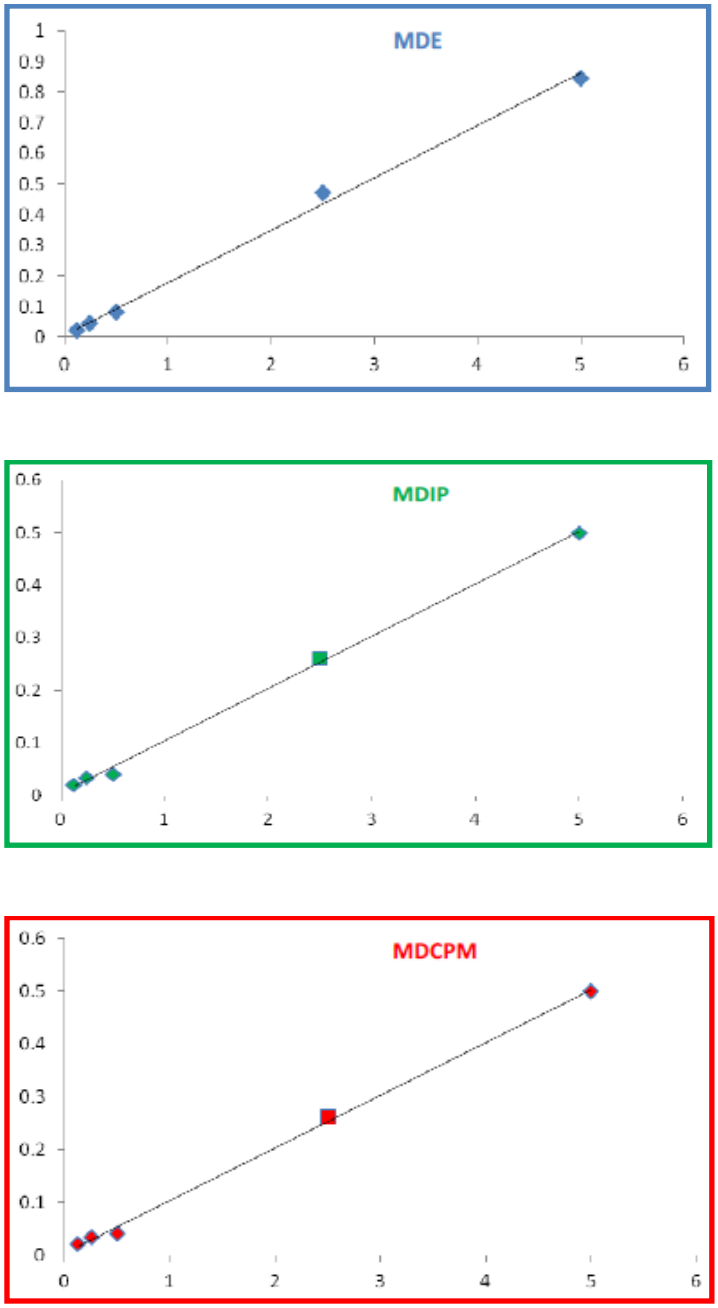


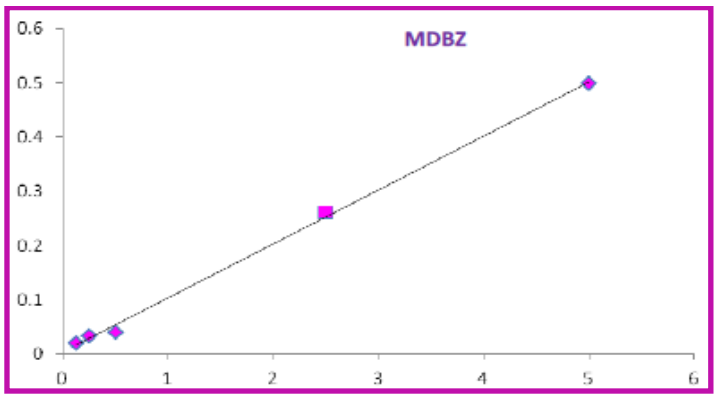
Per valutare il **range di linearità** campioni di urina free sono stati fortificati con lo standard interno e gli analiti target a diversi livelli di concentrazione, e dunque estratti col metodo precedentemente descritto. Le curve di calibrazione sono state costruite mettendo in relazione il rapporto tra le aree dei picchi di ciascun analita e lo standard interno con il rapporto delle rispettive concentrazioni. Tutte le amfetamine analizzate hanno un range di linearità compreso

tra 10 e 500 ng/ml. Tutti i coefficienti di regressione lineare sono sempre molto vicini all'unità, il che garantisce la **riproducibilità** del metodo strumentale (**Tabella 1**). In **Figura 21** sono riportate le curve di calibrazione in matrice delle quattro amfetamine studiate.

Figura 21

Curve di calibrazione delle MDAs





I limiti di determinazione (LODs) e di quantificazione (LOQs) ottenuti (**Tabella 1**) sono sufficientemente bassi da permettere di rilevare e quantificare con certezza anche concentrazioni molto piccole di sostanza nella matrice urina.

L'**accuratezza** del metodo è stata espressa in termini di **recupero percentuale**. I recuperi sono stati calcolati analizzando campioni di urina fortificati a tre differenti livelli di concentrazione (25, 100 e 400 ng/ml) in 10 replicati per ciascuna concentrazione. I valori ottenuti sono tutti superiori al 69% (**Tabella 2**), il che dimostra che la metodologia estrattiva impiegata è particolarmente idonea per l'analisi di questa serie di amfetamine.

Del metodo proposto è stato studiato anche l'**effetto matrice**: 9 campioni di matrice bianca sono stati estratti secondo il metodo descritto precedentemente, e sono stati successivamente fortificati con gli analiti a tre differenti livelli di concentrazione (25, 100 e 400 ng/ml); i risultati ottenuti, riportati in **Tabella 2** , sono tutti entro i valori accettabili per l'ordine di grandezza considerato (≤20%), essendo tutti inferiori all'11% [**113**].

La **ripetibilità** è stata calcolata in termini di deviazione standard relativa (**RSD**) sui rapporti delle concentrazioni rilevate dagli spike ottenuti usando soluzioni di amfetamine alle concentrazione di 25, 100 e 400 ng/ml; in tutti i casi i valori ottenuti sono ben al di sotto del 15%, il che permette di affermare che il metodo proposto è ripetibile sia per quanto riguarda la ripetibilità intraday che per quanto riguarda la ripetibilità interday (**Tabella 3**).

Infine è stata valutata la stabilita dei campioni di urina sottoposti a processo estrattivo e analizzati subito e dopo 1 e 2 mesi dalla preparazione. I campioni si sono dimostrati stabili fino a 2 mesi se conservati a +4°C. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la metodologia analitica impiegata è particolarmente idonea per le analisi multiresiduo di questa serie di amfetamine.

Tabella 1

Tempi di ritenzione, parametri di calibrazione, limiti di determinazione (LODs) e limiti di quantificazione (LOQs) per MDE, MDIP, MDCPM e MDBZ in urina di ratto

Composto	t_R (min)	*r*	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
MDEA	10.4	0.996	5.2	15.7
MDIP	11.4	0.991	10.5	23.4
MDCPM	13.0	0.993	8.0	24.2
MDBZ	17.5	0.997	4.2	12.4

RT: tempo di ritenzione; SD: deviazione standard

Tabella 2

Recupero ed Effetto Matrice

Composto	Concentrazione (ng/ml)	Recupero (%) (*n*=10)	Effetto matrice (%) (*n*=9)
MDE	25	69.2	5.50
	100	74.4	4.71
	400	75.2	9.10
MDIP	25	69.6	4.93
	100	70.6	6.50
	400	71.6	7.49
MDCPM	25	82.0	10.1
	100	83.2	9.28
	400	88.5	4.50
MDBZ	25	96.0	5.89
	100	98.1	7.21
	400	92.9	10.8

Tabella 3

Ripetibilità Intraday e Ripetibilità Interday

Analita	Concentrazione (ng/ml)	Precisione (RSD) *n*=5	
		Intraday	Interday
MDE	25	5.20	11.0
	100	6.12	10.3
	400	8.53	9.90
MDIP	25	5.21	13.1
	100	7.30	10.9
	400	12.4	7.80
MDCPM	25	9.91	11.5
	100	7.60	13.0
	400	6.84	10.1
MDBZ	25	6.63	14.1
	100	8.70	13.7
	400	9.41	10.4

RSD: deviazione standard relativa

APPLICAZIONE *IN VIVO*

Il metodo analitico precedentemente descritto e validato è stato applicato all'analisi *in vivo* di campioni di urina prelevati da ratti ai quali sono state somministrate le amfetamine oggetto di studio. Ciascuna amfetamina viene somministrata per via orale, mediante sondino nasogastrico alla concentrazione di 1 mg/Kg, ad un gruppo di 3 ratti. I ratti vengono tenuti in gabbie metaboliche e da ciascuno si preleva un campione di urina a 3, 6, 24 e 36 h. L'urina viene estratta ed analizzata come descritto in precedenza.

I risultati (**Tabella 4**) mostrano che si tratta di un metodo affidabile; i risultati sull'MDE confermano quanto riportato in letteratura [**114**], in cui si attesta che la sostanza inalterata viene rinvenuta nell'urina anche oltre 33 ore dopo l'assunzione.

Tabella 4

Concentrazione urinaria dei derivati MDAs in urina di ratto (*n*=3) dopo somministrazione orale

Tempo (h)	Concentrazione urinaria (ng/ml)			
	MDEA (*n*=3)	**MDIP (*n*=3)**	**MDCPM (*n*=3)**	**MDBZ (*n*=3)**
3	83.5± 0.53	19.2± 0.41	84.5± 0.35	42.3± 0.33
6	44.5± 0.25	4.9± 0.13	52.9± 0.29	27.5± 0.24
24	34.1± 0.31	n. d.	37.6± 0.40	16.8± 0.17
36	n.d.	/	n.d.	n.d.

n. d.: non determinabile

Le MDAs mostrano profili di eliminazione diversi. Non ci sono differenze degne di nota per quel che riguarda i livelli urinari di MDE e MDCPM a 3, 6 e 24 ore. Sono state trovate tracce anche di MDBZ alle 24 ore, ma a concentrazioni dimezzate. MDIP ha mostrato il profilo di eliminazione più breve, con basse concentrazioni già a 6 ore e nessuna traccia a 24 ore dalla somministrazione.

ANALISI MULTIRESIDUO BOX [115]

STRUMENTAZIONE

Le feniletilamine ossigenate appartenenti alla serie BOX sono state analizzate con un HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) accoppiato ad uno spettrometro di massa Applied Biosystem MDS Sciex (Concord, Ontario, Canada) API 2000 triplo quadrupolo. I dati sono stati raccolti e processati con il software Applied Biosystem Analyst versione 1.6. L'analisi quantitativa è stata fatta in accordo con i tempo di ritenzione e con le due transizioni MRM selezionate.

SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

Anche per questo gruppo di analiti si è deciso di lavorare con una colonna impaccata con fase stazionaria C18. Condizioni cromatografiche:

- volume di iniezione 20 μl
- flusso 300 μl/min
- colonna Phenomenex Luna C18 (100 × 2.0 mm i.d., particle size 3 μm) equipaggiata con una precolonna Phenomenex C18 (4 x 2.1 mm, particle size 3 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- fase mobile: soluzione di acido formico allo 0.1% in acqua (A); soluzione di acido formico allo 0.1% in acetonitrile (B)
- gradiente: condizioni iniziali, 20% B; 0-9 minuti, gradiente lineare dal 20 al 40% B; 9-11 minuti, eluizione isocratica al 40% B; 11-11.01 minuti, passaggio dal 40 al 20% B; 11.01-15 minuti, eluizione isocratica al 20% B, per riequilibrare alle condizioni iniziali.

METODO DI ACQUISIZIONE IN SPETTROMETRIA DI MASSA E VALIDAZIONE

Nella fase preliminare è necessario effettuare l'ottimizzazione di una serie di parametri strumentali per ciascun analita, in modo da individuare le migliori condizioni di acquisizione del segnale originato dalla molecola d'interesse. Per fare questo ogni analita è stato analizzato singolarmente mediante infusione diretta, cioè senza l'utilizzo della separazione cromatografia, alla concentrazione di 10 μg/ml. In tutti i casi si è lavorato in modalità di ionizzazione positiva. Una volta visualizzato tramite scansione del campione lo ione molecolare ([M+1], ossia la massa dell'analita aumentata di una unità di massa a causa della protonazione della molecola), se ne è studiata la frammentazione sviluppando un esperimento "product ion", dal quale è possibile individuare tutti i frammenti che si generano dallo ione molecolare. Questo esperimento

permette di selezionare le transizioni caratteristiche della molecola, e di ottimizzarle nell'esperimento successivo MRM (Multiple Reaction Monitoring). In particolare, si è deciso di selezionare una sola transizione per lo standard interno, e due transizioni per ciascun analita. Di queste la più abbondante viene utilizzata per la quantificazione e la meno abbondante come ulteriore conferma dell'identità della molecola.

I parametri strumentali del triplo quadrupolo che sono stati studiati sono:

- DP: differenza di potenziale tra l'orifice plate e la prima lente del filtro quadrupolare;
- EP: differenza di potenziale tra la prima e la terza lente del filtro quadrupolare;
- CE: differenza di potenziale tra la terza lente del filtro quadrupolare e la cella di collisione;
- CXP: differenza di potenziale tra la cella di collisione e il terzo quadrupolo.

In **Tabella 5** sono riportati i parametri di ottimizzazione del metodo di acquisizione. Gli altri parametri non riportati in tabella sono: temperatura della sorgente 400°C, voltaggio del capillare 5000 V, gas di cortina (CUR) 6 unità arbitrarie, gas di collisione (CAD) 10 unità arbitrarie, declustering potential (DP) 20 V, focusing potential (FP) 400 V, entrance potential (EP) 10 V. I dati sono stati elaborati utilizzando il software Applied Biosystem Analyst versione 1.6.

Tabella 5

Parametri utilizzati per la conferma e la quantificazione delle BOX in LC-MS/MS

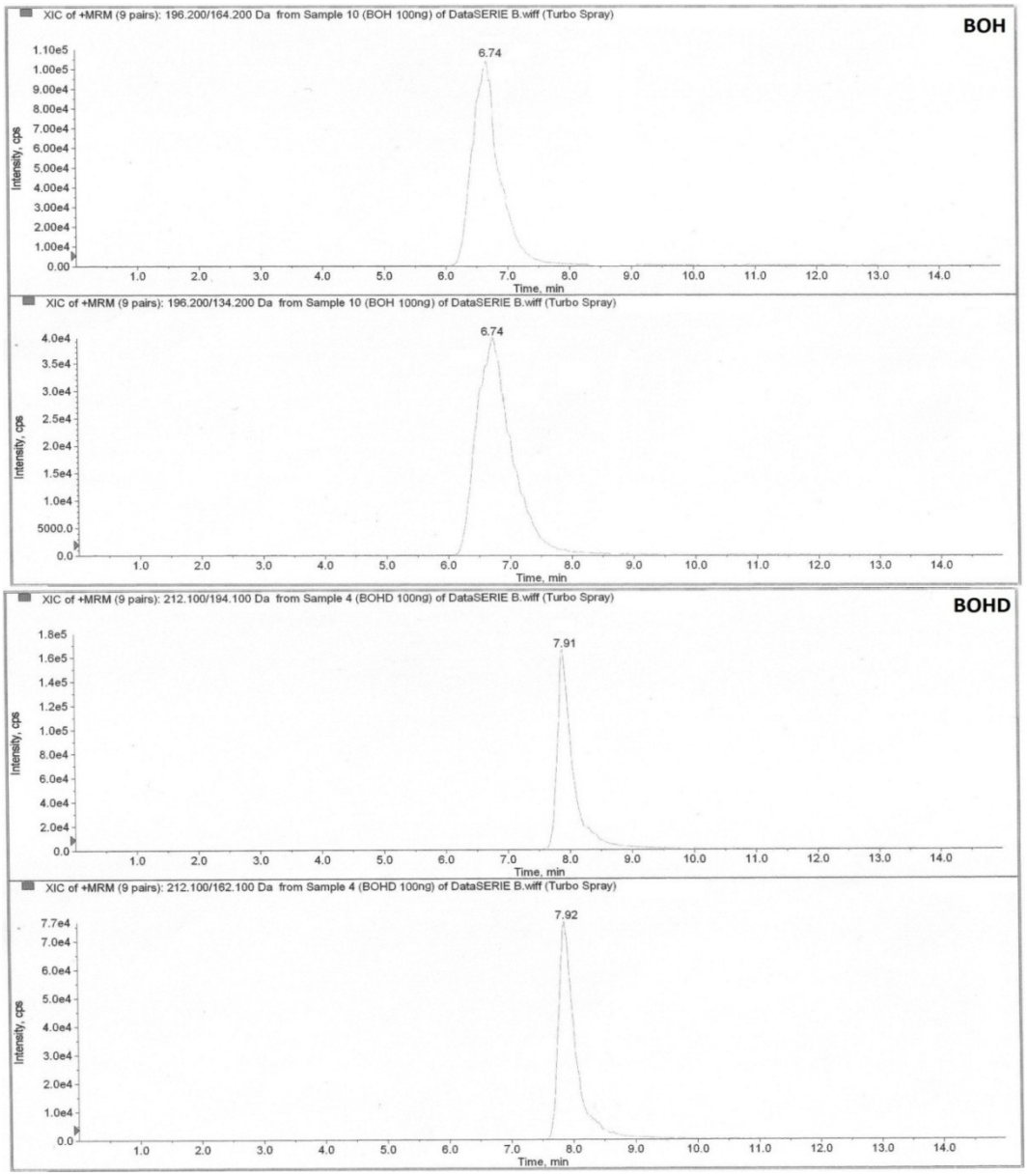
Composto	Ione molecolare (*m/z*)	Transizioni (*m/z*)	CE (V)	CXP
BOB	291.0	259.0 [a]	27	4
		179.0 [b]	18	5
BOD	226.3	194.3 [a]	24	3
		164.3 [b]	17	5
BOHD	212.1	194.1 [a]	23	6
		162.1 [b]	19	4
BOH	196.2	164.2 [a]	30	5
		134.2 [b]	20	5
IS	186.4	169.4	20	5

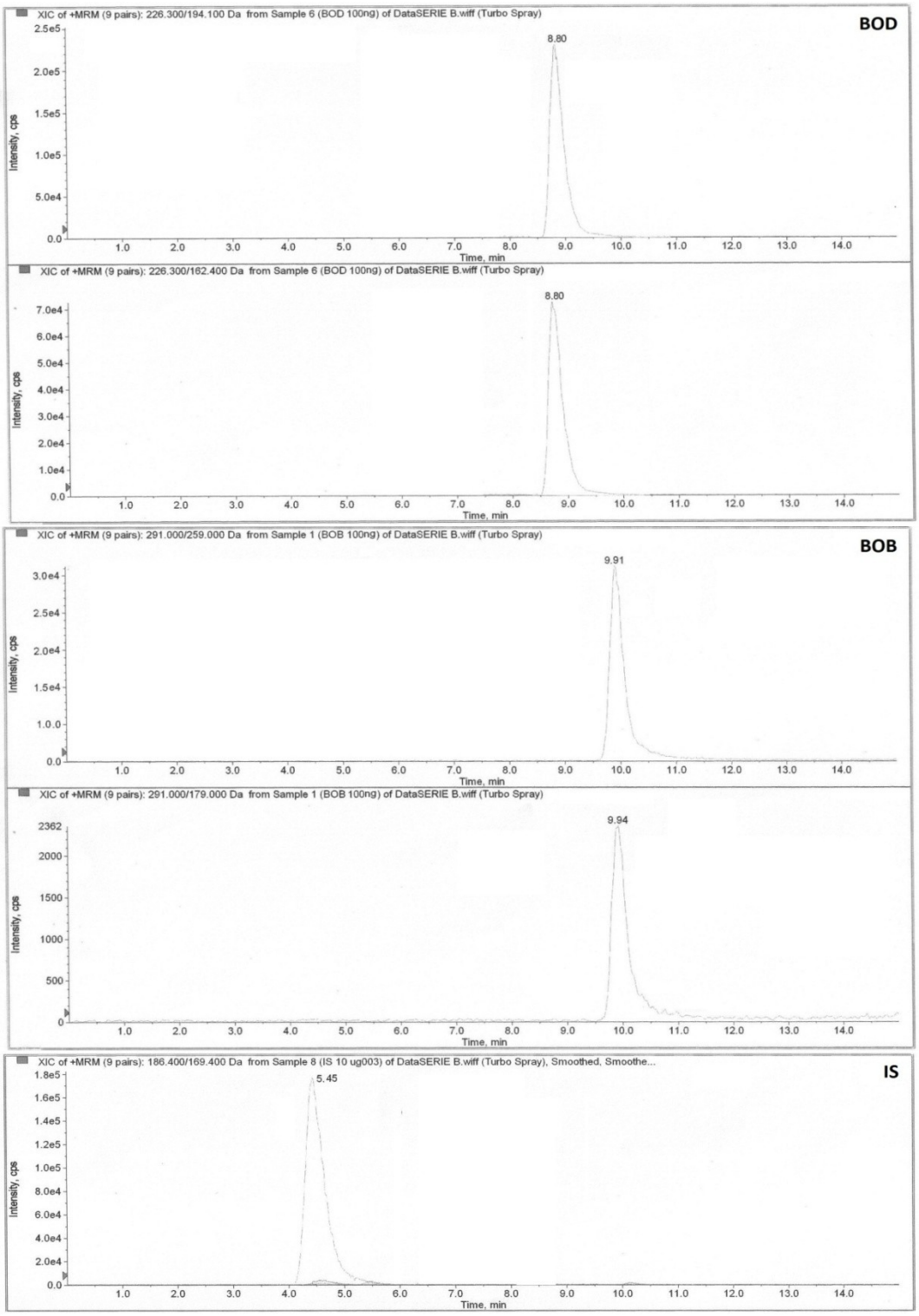
[a] transizione utilizzata per la quantificazione;
[b] transizione utilizzata per la conferma

Nella **Figura 22** è riportato un cromatogramma di una miscela standard alla concentrazione di 100 ng/ml degli analiti target e dello standard interno, in cui è possibile individuare le due transizione selezionate per ciascun analita.

Figura 22

Cromatogrammi dei singoli standard alla concentrazione di 100 ng/ml registrati alle due transizioni usate per la quantificazione e per la conferma





Una volta messo a punto il metodo di separazione e di acquisizione, si è passati all'estrazione degli analiti target dal plasma. L'estrazione selettiva delle amfetamine dai campioni di plasma è stata ottenuta attraverso la tecnica SPE con l'ausilio di colonnine Supel^{TM}-Select HLB, caratterizzate da una fase polimerica idrofila a base stirenica modificata. Il campione di plasma (0.2 ml) è stato miscelato con un uguale volume di tampone ammonio acetato (25 mM, aggiustato a pH 10). La

miscela così ottenuta è stata caricata su una colonnina Supel^{TM}-Select HLB (30 mg/ml), precedentemente attivata e condizionata con 1 ml di metanolo e 1 ml di tampone. Dopo il caricamento del campione, la colonna è stata lavata con 1 ml di acqua MilliQ e con 1 ml di metanolo al 5% in acqua e portata a secco. Gli analiti sono quindi stati fatti eluire con 1 ml di una miscela metanolo/acetonitrile 1/1, e l'eluato è stato portato a secco sotto corrente d'azoto. Infine, è stato ripreso con 0.2 ml di fase mobile per lo step successivo di analisi. Anche in questo caso si sono ottenuti estratti che hanno fornito cromatogrammi privi di interferenti e sufficientemente puliti in corrispondenza dei tempi di ritenzione degli analiti. Successivamente il metodo estrattivo è stato applicato a campioni di plasma fortificati con opportune aliquote di amfetamine per valutare l'accuratezza e la precisione dei vari parametri statistici. Nella **Figura 23** è riportato un cromatogramma di un estratto di plasma fortificato con i quattro analiti target e lo standard interno, alla concentrazione di 100 ng/ml.

Per valutare il **range di linearità** campioni di plasma free sono stati fortificati con lo standard interno e gli analiti target a diversi livelli di concentrazione, e dunque estratti col metodo precedentemente descritto. Le curve di calibrazione sono state ottenute analizzando quantità note e variabili di analita con quantità note e costanti di standard interno e mettendo in relazione il rapporto tra le aree dei picchi di ciascun analita e quella dello standard interno, con il rapporto tra le concentrazioni (note) di analita e standard interno. Tutte le amfetamine analizzate hanno un range di linearità compreso tra 10 e 500 ng/ml. Nella **Figura 24** sono riportate le curve di calibrazione in matrice delle quattro amfetamine studiate. In ogni caso i coefficienti di regressione lineare sono molto vicini all'unita, il che garantisce la **riproducibilità** del metodo strumentale (**Tabella 6**).

Figura 23

Cromatogramma di un estratto di plasma fortificato con le quattro amfetamine e lo standard interno alla concentrazione di 100 ng/ml

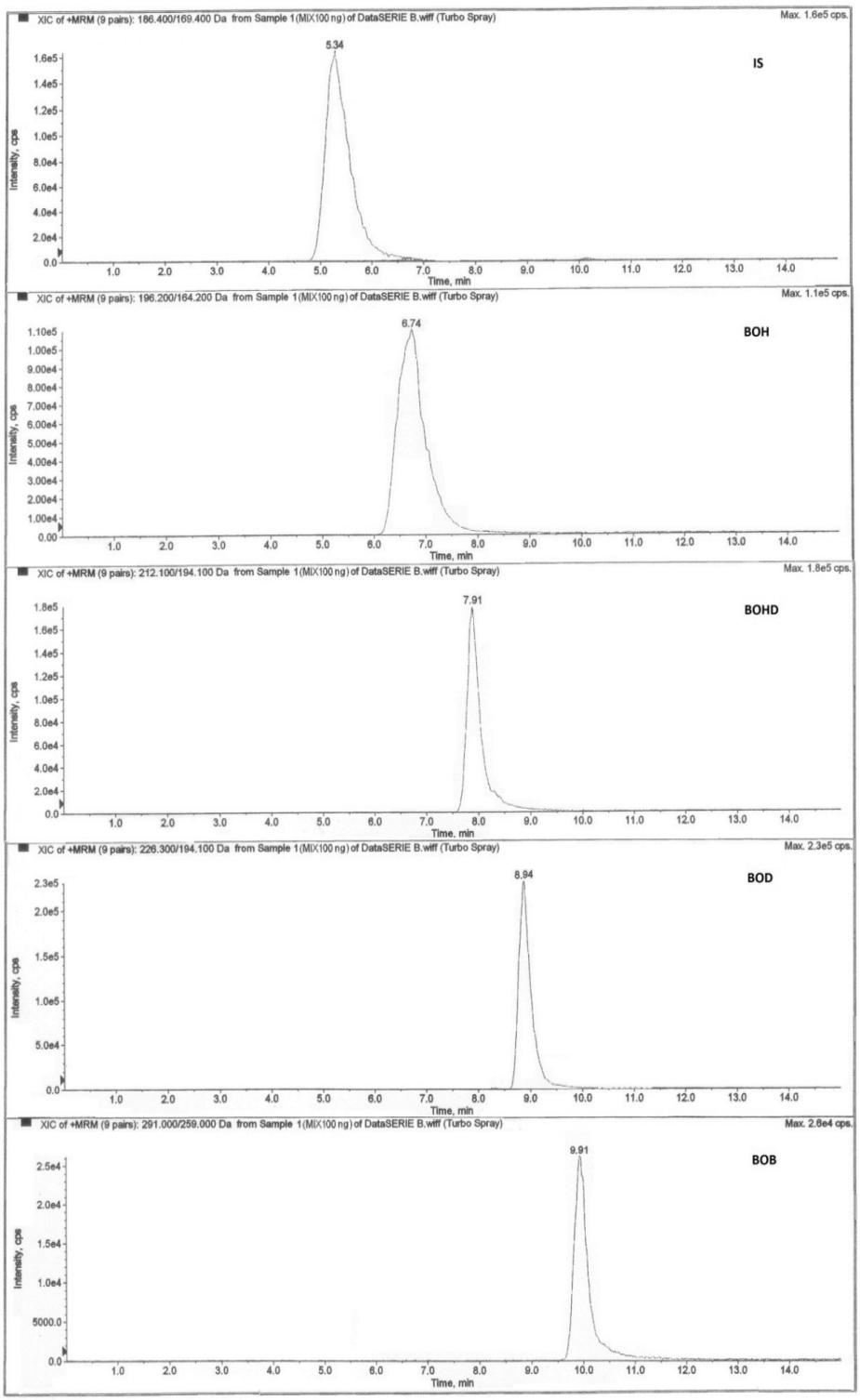
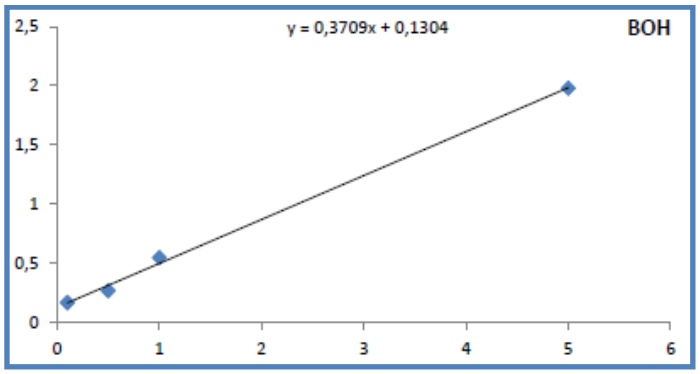
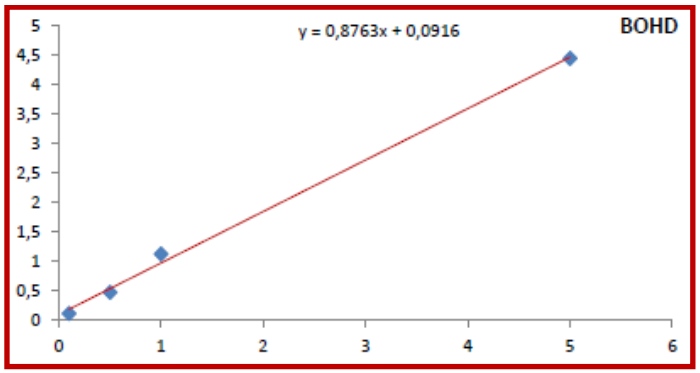
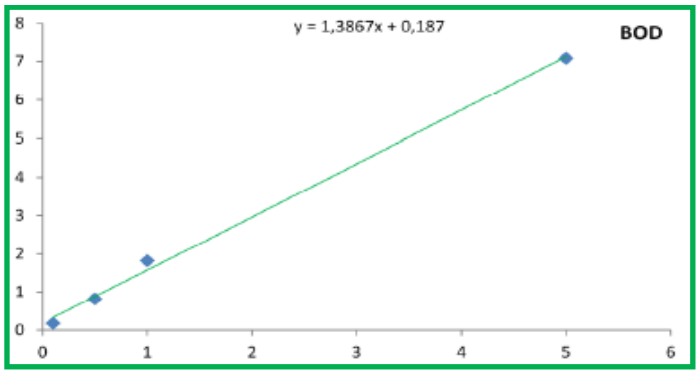


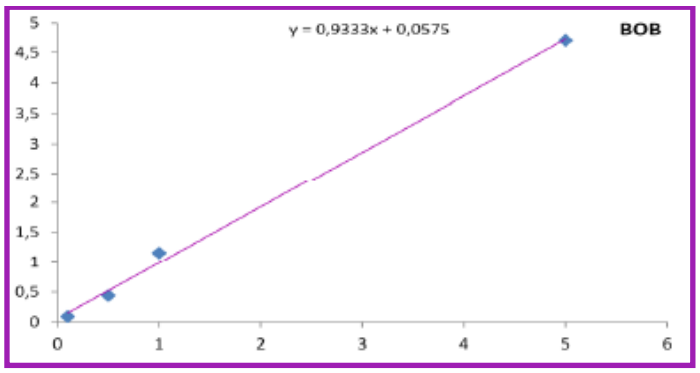
Figura 24

Curve di calibrazione delle quattro amfetamine in matrice









I limiti di determinazione (LODs) e di quantificazione (LOQs) ottenuti (**Tabella 6**) sono sufficientemente bassi da permettere di rilevare e quantificare con certezza anche concentrazioni molto piccole di sostanza nella matrice plasma.

Tabella 6

Parametri di validazione del metodo

Composto	t_R (min)	r	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
BOB	9.91	0.998	3.33	9.81
BOH	6.74	0.998	2.23	7.40
BOD	8.94	0.998	5.95	15.47
BOHD	7.91	0.998	3.37	9.11

Del metodo proposto è stato studiato anche l'**effetto matrice**: 9 campioni di matrice bianca sono stati estratti secondo il metodo descritto precedentemente e sono stati successivamente fortificati con gli analiti a tre differenti livelli di concentrazione (20, 200 e 400 ng/ml); come si può vedere dai risultati in **Tabella 7** tutti e quattro gli analiti presentano un lieve effetto matrice (da -7.86 a 6.86%). In letteratura [**113**] è riportato che sono considerati trascurabili valori di effetto matrice che vanno dal -20% (soppressione ionica) al +20% (enhancement); nel nostro caso l'effetto matrice rientra nei limiti previsti e dunque non inficia l'applicabilità e la validità del metodo. L'**accuratezza** è stata espressa in termini di **recupero percentuale**. I recuperi sono stati calcolati analizzando campioni di plasma fortificati a tre differenti livelli di concentrazione (20, 200 e 400 ng/ml) in 10 replicati per ciascuna concentrazione. I valori ottenuti sono tutti superiori al 70% (**Tabella 7**), il che dimostra che la metodologia estrattiva impiegata è particolarmente idonea per l'analisi di questa serie di amfetamine. Alcuni recuperi mostrano valori superiori al 100% in seguito ad un enhancement della risposta dovuto ad un effetto matrice positivo. La **ripetibilità** è stata calcolata in termini di deviazione standard relativa (**RSD**) analizzando soluzioni di amfetamine alle concentrazione di 20, 200 e 400 ng/ml; in tutti i casi i valori ottenuti sono ben al di sotto del 15%, il che permette di affermare che il metodo proposto è ripetibile sia per quanto riguarda la ripetibilità intraday che per quanto riguarda la ripetibilità interday (**Tabella 8**).

Tabella 7

Recupero ed Effetto Matrice

Composto	Concentrazione (ng/ml)	Recupero (%) (*n*=10)	Effetto matrice (%) (*n*=9)
BOB	20	70.6	0.45
	200	84.9	-7.86
	400	89.5	2.78
BOH	20	104.2	1.92
	200	108.5	6.86
	400	83.0	-2.87
BOD	20	84.3	2.30
	200	82.6	-7.57
	400	86.9	-1.85
BOHD	20	88.5	-0.49
	200	85.9	-5.38
	400	89.4	1.28

Tabella 8

Ripetibilità intraday e interday

Composto	Concentrazione (ng/ml)	Ripetibilità intraday (RSD)	Ripetibilità interday (RSD)
BOB	20	4.5	12.1
	200	7.4	9.7
	400	11.3	10.6
BOH	20	9.5	11.1
	200	11.0	13.1
	400	8.1	9.4
BOD	20	4.6	8.5
	200	8.9	9.6
	400	5.5	10.1
BOHD	20	10.4	13.5
	200	6.1	13.1
	400	9.2	10.7

Infine, è stata valutata la **stabilità** dei campioni di plasma sottoposti a processo estrattivo e analizzati subito e dopo 1 e 2 mesi dalla preparazione. I campioni si sono dimostrati stabili fino a 2

mesi se conservati a +4°C. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la metodologia analitica impiegata è particolarmente idonea per le analisi multiresiduo di questa serie di amfetamine

APPLICAZIONE *IN VIVO*

Il metodo analitico precedentemente descritto e validato è stato applicato all'analisi di campioni di plasma prelevati da ratti ai quali sono state somministrate le amfetamine oggetto di studio. Ciascuna amfetamina viene somministrata per via orale mediante sondino nasogastrico alla concentrazione di 1 mg/Kg ad un gruppo di 6 ratti; da ciascuno si preleva un campione di plasma a 15min, 30min, 60min, 120min, 240min e 360min. Il plasma viene estratto ed analizzato come descritto in precedenza (**Tabella 9**).

Tabella 9

Concentrazioni plasmatiche di BOB, BOH, BOD, BOHD dopo singola somministrazione orale

	Concentrazione plasmatica ng/ml			
Tempo	**BOB**	**BOH**	**BOD**	**BOHD**
15min	110.0 ± 1.8	90.0 ± 1.1	107.0 ± 2.0	88.4± 0.9
30min	77.2 ± 1.6	66.8 ± 4.3	57.2 ± 4.9	73.0 ± 1.6
60min	35.9 ± 4.0	28.2 ± 2.3	30.6 ± 4.7	28.1 ± 2.0
120min	10.1 ± 0.7	11.1 ± 0.2	12.5 ± 1.8	11.3 ± 1.1
240min	/	/	/	/
360min	/	/	/	/

Lo studio della concentrazione delle amfetamine nel tempo ha permesso di ottenere i parametri farmacocinetici descritti nella **Tabella 10.** Tutti gli analiti hanno mostrato un rapido assorbimento (Tmax=15 min). Le concentrazioni massime variano da 88 ng/ml per la BOHD a 110 ng/ml per la BOB (PK Solutions software, version 2.0, Summit Research Services, Montrose, CO, USA).

Tabella 10

Parametri farmacocinetici nel ratto (n=6) dopo singola somministrazione orale

Composto	T½ (min)	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (min)	AUC (0-t) (ng·min/ml)
BOB	53.3	110	15.0	6105
BOD	47.9	107	15.0	5394
BOH	49.8	90	15.0	4995
BOHD	61.5	88	15.0	5538

T½: tempo di dimezzamento; C_{max}: concentrazione massima; T_{max}: tempo richiesto per il raggiungimento della concentrazione massima; AUC (0-t): area sotto la "curva concentrazione nel sangue-tempo", in questo esperimento da 0 a 360 minuti

SEPARAZIONE ENANTIOMERICA DI 13 NUOVI DESIGNER DRUGS [116]

In questo studio è stata messa a punto la separazione enantiomerica di un set di 13 amfetamine chirali, utilizzando diversi tipi di ciclodestrine come selettori chirali. In **Figura 25** sono riportate le formule degli analiti target.

In particolare, l'attenzione è stata rivolta all'individuazione del miglior selettore chirale per le amfetamine scelte, e all'ottimizzazione di una serie di parametri come il pH, il voltaggio applicato, la concentrazione del selettore chirale e la lunghezza del capillare. Degli ulteriori esperimenti sono stati fatti con l'aggiunta di modificatori organici (acetonitrile e metanolo) in differenti percentuali.

STRUMENTAZIONE

Le amfetamine chirali oggetto di studio sono state separate tramite elettroforesi capillare utilizzando un 3DCE (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) interfacciato con un rivelatore DAD 1040°, equipaggiato con un capillare di silice fusa (50 μm ID) di 40 cm di lunghezza totale (lunghezza effettiva 31.5 cm), termostatato a 20°C. Il voltaggio è stato impostato a +25 kV e la lunghezza d'onda del rivelatore a 210 nm.

Prima di iniziare le analisi, per ogni analita è stata fatta una scansione UV in un range compreso tra 200 e 400 nm, in modo da poter selezionare la lunghezza d'onda ottimale. Il tampone acquoso stato utilizzato un tampone acquoso 63.5 mM di H_3PO_4 e 46.9 mM di NaOH (pH 2.6); questo buffer ha una forza ionica 50 mM e un alto potere tamponante (31.8 mM/pH), come indicato dal software Phoebus [**117**].

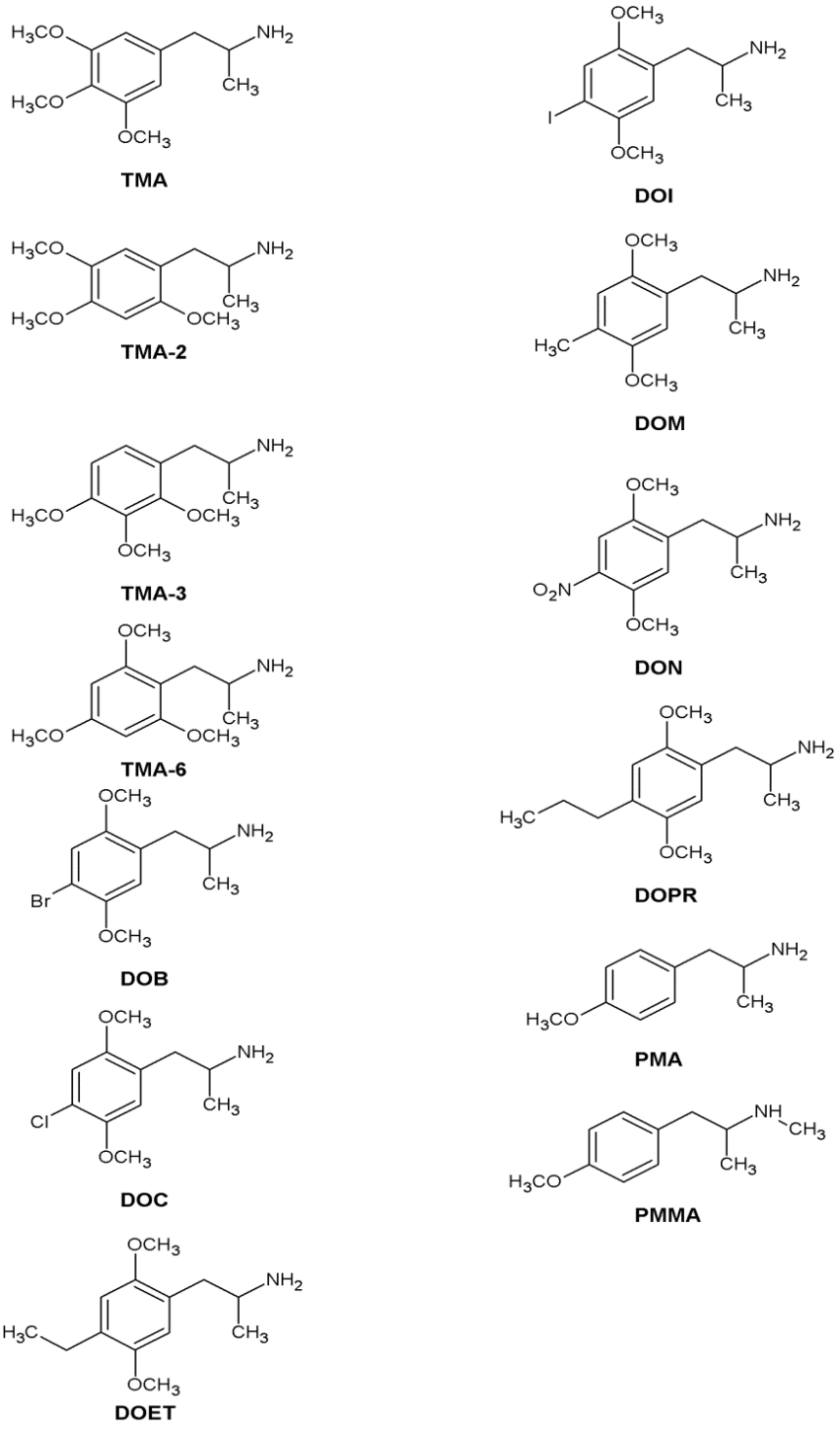
Il pH del tampone è stato aggiustato ad appropriati valori (3.5, 5.0, 6.0) con NaOH concentrata. Il "running buffer", contenente una singola ciclodestrina, è stato preparato pesando una determinata quantità di selettore chirale, e dissolvendolo nel tampone ad un determinato pH. Ogni amfetamina è stata analizzata a varie concentrazioni di selettore chirale (da 1 a 40 mg/ml). Ulteriori studi hanno previsto l'aggiunta di modificatori organici (metanolo e acetonitrile al 5% o 10%) durante l'allestimento del tampone.

I campioni da analizzare di ciascuna amfetamina sono stati preparati in acqua MilliQ, alla concentrazione di 50 μg/ml. Tali soluzioni sono state degasate agli ultrasioni e filtrate con filtri di cellulosa (diametro dei pori 0.45 μm) prima dell'uso.

All'inizio di ogni giornata di lavoro il capillare è stato trattato con NaOH 0.1 N (5 min), acqua (5 min), BGE (5 min); prima di ogni iniezione è stato attivato come segue: acqua (2 min), NaOH 1 N (3 min), acqua (3 min), BGE (5 min), running buffer (5 min). Ogni analisi è stata ripetuta in triplicato.

Figura 25

Strutture molecolari degli analiti target



STUDIO DI SEPARAZIONE ENANTIOMERICA

É ben noto che le ciclodestine sono dei selettori chirali molto versatili, in grado di separare gli enantiomeri di un ampio spettro di molecole con le più svariate caratteristiche chimiche. Purtroppo però, a causa delle interazioni aspecifiche tra analita e selettore chirale, non è possibile prevedere quale ciclodestrina può separare una determinata molecola (o classe di molecole). Gli analiti possono interagire sia con la superficie polare che con la cavità apolare della ciclodestrina, quindi eventuali sostituzioni sugli ossidrili possono favorire o sfavorire la formazione di complessi di inclusione o modificarne la stabilità, migliorando o peggiorando il profilo di separazione. In genere, il "miglior" selettore chirale è scelto empiricamente, effettuando uno screening di differenti tipi in differenti condizioni.

Per questo motivo, in questo lavoro è stata studiato il profilo di enantioseparazione di un set di 13 nuovi designer drugs amfetamino-simili, utilizzando singolarmante tre differenti β-ciclodestrine (la β-ciclodestrinasolfato, carbossimetil-β-ciclodestrina e la dimetil-β-ciclodestrina).

É stato trovato che la β-ciclodestrinasolfato è in grado di separare tutte le amfetamine considerate, fornendo una risoluzione buona ed in alcuni casi eccellente (con valori di Rs che variano da 1.1 a 9.3) e tempi di analisi brevi (da 5.6 a 24.3, considerando il tempo di migrazione del secondo enantiomero), come riportato nella **Tabella 11**, utilizzando lo stesso buffer (63.5 mM H_3PO_4 e 46.9 mM NaOH) allo stesso pH (2.6), ma differenti concentrazioni di selettore chirale (da 1 mg/ml a 10 mg/ml). In queste condizioni l'enantiomero che interagisce in maniera più debole con il selettore chirale arriva per primo al rivelatore. L'aumento della concentrazione della ciclodestrina porta da una parte ad un incremento della risoluzione, dall'altra ad un aumento sensibile dei tempi di analisi in quanto gli analiti risultano più rallentati nella loro migrazione elettroforetica. In alcuni casi, con concentrazioni particolarmente elevate di ciclodestrina, si sono registrati tempi di migrazione superiori ai 120 minuti. È interessante evidenziare come concentrazioni troppo alte di ciclodestrina possano determinare un annullamento della capacità di separazione del selettore chirale. I parametri che sono stati ottimizzati sono il voltaggio applicato, la lunghezza del capillare, la concentrazione della ciclodestrina. Per quanto riguarda il voltaggio, il compromesso migliore tra tempo di analisi e risoluzione si è ottenuto a +25kV. A voltaggi più bassi si è registrato un aumento eccessivo dei tempi di migrazione, mentre a +30 kV è stato osservato un netto peggioramento in termini di risoluzione. La lunghezza del capillare è stata fissata a 40 cm (32.5 cm al rivelatore): lunghezze maggiori hanno dato tempi di analisi troppo lunghi (il più delle volte oltre 100 minuti) senza importanti guadagni in termini di risoluzione.

Nella **Figura 26** è riportata la separazione di DOB nelle condizioni ottimizzate (**Tabella 11**).

Tabella 11

Separazione enantiomerica di PMA, PMMA, DOB, DOC, DOET, DOI, DOM, DON, DOPR, TMA, TMA-2, TMA-3 e TMA-6. Condizioni: buffer 63.5 mM H_3PO_4 e 46.9 mM NaOH (pH 2.6 contenente S-β-CD, voltaggio applicato +25 kV)

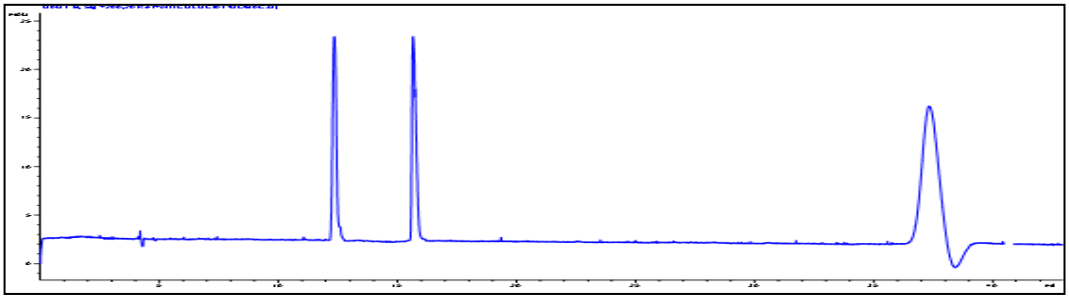
COMPOSTO	α	R_s	t_2 (min)
TMA[a]	1.031	1.1	24.3
TMA-2[a]	1.020	1.3	11.5
TMA-3[a]	1.023	1.4	15.1
TMA-6[a]	1.054	2.5	9.7
DOB[b]	1.331	9.3	15.9
DOC[b]	1.296	5.5	13.00
DOET[a]	1.050	2.6	14.45
DOI[c]	1.032	1.9	5.6
DOM[a]	1.111	6.0	10.5
DON[b]	1.028	1.1	9.1
DOPR[a]	1.059	2.8	15.6
PMA[c]	2.145	1.5	11.5
PMMA[c]	2.136	2.2	12.9

[a]10mg/ml S-β-CD, [b]5mg/ml S-β-CD, [c]1mg/ml S-β-CD

t_2 (min): tempo di migrazione del secondo enantiomero

Figura 26

Separazione enantiomerica di DOB a pH 2.6, utilizzando S-β-CD 5mg/ml (flusso elettrosmotico misurato con l'acetone)



Per ciò che concerne la concentrazione di ciclodestrina, come già accennato e riportato in **Tabella 11**, quella ottimale varia a seconda dell'amfetamina considerata. Nella **Figura 27** è possibile apprezzare come varia il profilo di separazione della DOET al variare della concentrazione del selettore chirale e della lunghezza del capillare.

Un'altra variabile fondamentale che è stata studiata è il pH del buffer. Per ogni amfetamina sono state effettuate delle analisi con la concentrazione ottimale di ciclodestrina, a diversi valori di pH (2.6, 3.6, 5.0, 6.0), come mostrato in **Tabella 12**. In tutti i casi si è registrata una drastica riduzione dei tempi di migrazione, che potrebbe essere spiegata con il fatto che in queste condizioni si ha un notevole incremento del flusso elettrosmotico. Riguardo invece alla separazione enantiomerica, è possibile individuare una correlazione tra l'aumento del pH e la riduzione della risoluzione: la separazione è ancora buona per alcuni analiti fino a pH 5.0, mentre nessuno si separa a pH 6.0. Il valore di pH migliore è 2.6, come si può vedere in **Figura 28**, nella quale si evidenzia l'alterazione della separazione enantiomerica di DOB al variare del pH, mantenendo costante la concentrazione di CD.

FIGURA 27

Separazione enantiomerica di DOET

(A) 1 mg/ml β-S-CD, capillare 70 cm

(B) 5 mg/ml β-S-CD, capillare 70 cm

(C) 10 mg/ml β-S-CD, capillare 70 cm

(D) 10 mg/ml β-S-CD, capillare 40 cm

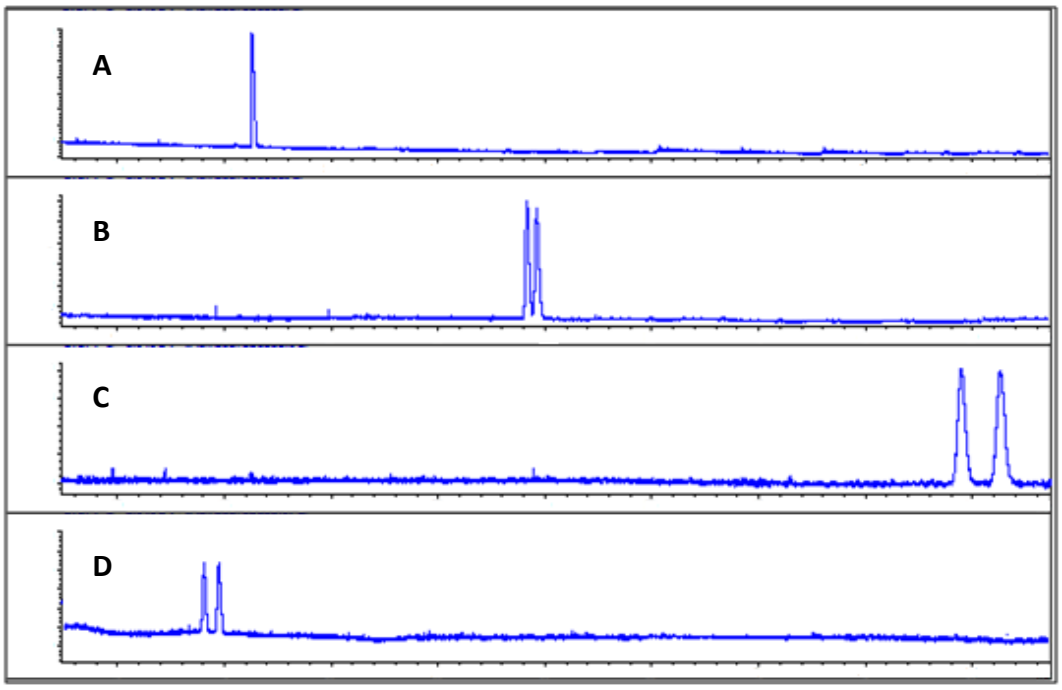


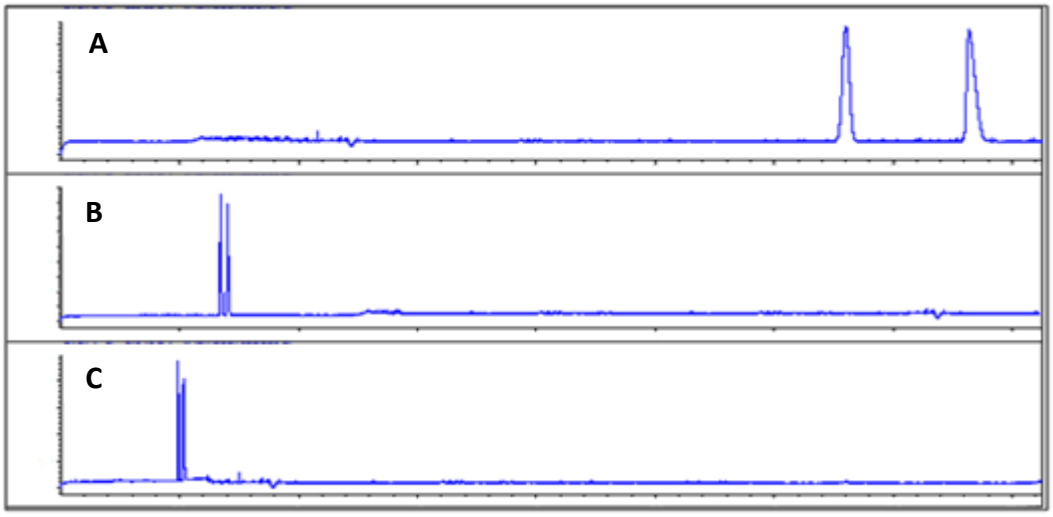
FIGURA 28

Separazione enantiomerica di DOB

(A) pH 2.6

(B) pH 3.6

(C) pH 5.0



A pH 5.0 per alcune amfetamine (DOB e DOI) la separazione è stata ottimizzata a concentrazioni maggiori di ciclodestrina, il che ha permesso di ottenere delle separazioni caratterizzate da una risoluzione eccellente e da un tempo di analisi veramente breve (circa 3 min). Per le altre amfetamine, a questi valori di pH, non si è osservata alcuna separazione anche con concentrazioni di selettore chirale pari a 20, 30 e 40 mg/ml. La serie delle trimetossiamfetamine ha mostrato una significante perdita in risoluzione a qualsiasi variazione di pH. DOC e PMMA mostrano invece valori di Rs paragonabili a 2.6, 3.6 e 5.0 unità di pH.

Tabella 12

Effetto della variazione del pH (2.6, 3.6, 5.0 e 6.0) sulla separazione enantiomerica di TMA, TMA-2, TMA-3, TMA-6, DOB, DOC, DOET, DOI, DOM, DON, DOPR, PMA e PMMA

	pH 2.6		pH 3.6		pH 5.0		pH 6.0	
	α_1	R_s	α_1	R_s	α_1	R_s	α_1	R_s
TMA[a]	1.031	1.1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
TMA-2[a]	1.020	1.3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
TMA-3[a]	1.023	1.4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
TMA-6[a]	1.054	2.5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
DOB[b]	1.331	9.3	1.041	5.1	1.086	3.3*	n.s.	n.s.*
DOC[b]	1.296	5.5	1.039	4.8	1.050	4.6	n.s.	n.s.*
DOET[a]	1.050	2.6	1.016	0.4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
DOI[c]	1.032	1.9	1.051	0.6*	n.s.	n.s.*	n.s.	n.s.
DOM[a]	1.111	6.0	1.024	1.6	1.032	1.3	n.s.	n.s.
DON[b]	1.028	1.1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
DOPR[a]	1.059	2.8	1.056	0.8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PMA[c]	2.145	1.5	1.040	0.5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PMMA[c]	2.136	2.2	1.126	1.8	1.151	2.1	n.s.	n.s.*

[a]10mg/ml S-β-CD, [b]5mg/ml S-β-CD, [c]1mg/ml S-β-CD

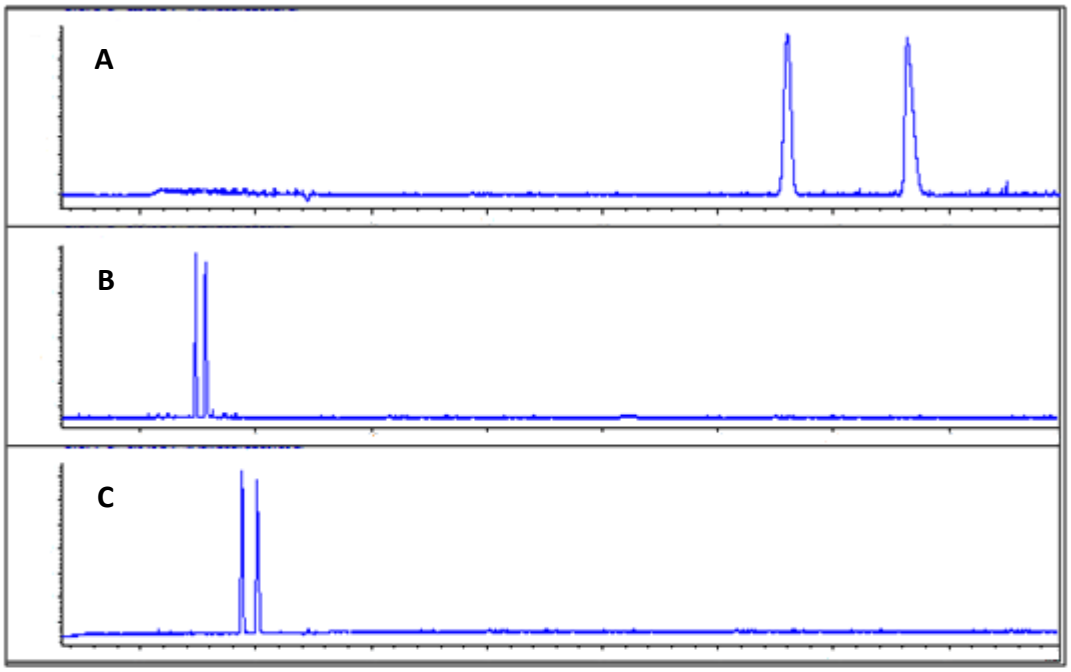
*buona separazione ottenuta con concentrazioni maggiori di S-β-CD (dati non tabellati)

n.s.: non separate

Ulteriori esperimenti sono stati condotti con l'aggiunta di solventi organici nell'allestimento del buffer a pH 2.6 (**Tabella 13**). Spesso, i solventi organici come il metanolo e l'acetonitrile sono utilizzati come modificatori organici con lo scopo di modificare i risultati della separazione enantiomerica in elettroforesi capillare [**58**,**118**,**119**]. Tali sostanze sono in grado di cambiare diversi parametri fondamentali per questo tipi di analisi, come la costante di stabilità dei complessi di inclusione tra analita e selettore chirale, il flusso elettrosmotico e, quindi, il tempo di analisi. A seconda dell'analita e del selettore chirale considerato, i modificatori organici possono migliorare o peggiorare la separazione. In questo lavoro si è deciso di determinare le conseguenze relative all'aggiunta del 5 e 10% di acetonitrile e metanolo al sistema di separazione su alcune della amfetamine studiate, con una concentrazione di ciclodestrina che varia da amfetamina ad

amfetamina, e che è stata ottimizzata nella prima fase di studio. In tutti i casi è stato possibile evidenziare un netto decremento dei tempi di migrazione e una significativa riduzione della risoluzione (nella **Figura 29** è evidenziato tale andamento nella separazione di DOB).

Figura 29
(A) BGE 100% acquoso
(B) BGE 5% metanolo
(C) BGE 5% acetonitrile



Alcune amfetamine mantengono una buona risoluzione (DOB, DOC, DOM, PMMA), mentre altre non mostrano alcun accenno di separazione (DOI, DON). La generale diminuzione della capacità di separazione del sistema può essere attribuita ad una diminuzione della costante di legame analita/selettore chirale all'aumento della percentuale di modificatore organico [**120**]. É ampiamente riconosciuto che i solventi organici che non presentano nuclei aromatici sono in grado di formare essi stessi dei complessi di inclusione con le ciclodestrine: quando ciò avviene, si instaura un meccanismo competitivo tra la molecola di solvente organico e la molecola di analita, che può essere "spiazzata" dalla sua interazione col selettore.

Tabella 13

Effetto dell'aggiunta di metanolo e acetonitrile nel BGE

	100% acq		5% MeOH		10% MeOH		5% ACN		10% ACN	
	α_1	R_s	α_1	R_s	α_1	R_s	α_1	R_s	α_1	R_s
TMA-6 [a]	1.054	2.5	1.015	1.2	1.023	1.2	1.020	1.2	1.011	0.9
DOB[b]	1.331	9.3	1.069	3.7	1.043	2.9	1.076	3.9	1.033	2.2
DOC[b]	1.296	5.5	1.073	4.9	1.051	3.6	1.082	5.1	1.042	2.8
DOI[c]	1.032	1.9	1.018	0.6	n.s.	n.s.	1.010	0.5	n.s.	n.s.
DOM [a]	1.111	6.0	1.027	1.6	1.030	1.9	1.036	2.1	1.027	1.3
DON[b]	1.028	1.1	1.006	n.s.	n.s.	n.s.	1.015	0.4	n.s.	n.s.
PMMA[c]	2.136	2.2	1.268	2.2	1.216	2.3	1.129	2.1	1.159	2.1

[a]10 mg/ml S-β-CD, [b]5 mg/ml S-β-CD, [c]1 mg/ml S-β-CD
n.s.: non sepatata

Le amfetamine oggetto di studio sono state analizzate anche con la carbossimetil-β-ciclodestrina e con la dimetil-β-ciclodestrina. Tra queste due, teoricamente, quella che dovrebbe fornire i risultati migliori è la carbossimetil, in quanto si tratta di una ciclodestrina carica negativamente. I risultati, comunque, non sono stati affatto soddisfacenti: solo tre delle tredici amfetamine studiate hanno mostrato una separazione (DOPR, DOC e DOB).

Con la dimetil-β-ciclodestrina non è registrato alcun dato positivo in termini di separazione. É ben noto che le prospettive migliori si hanno nel caso in cui l'analita e il selettore chirale presentino carica opposta. Ciò è dovuto all'aumento della differenza di mobilità tra i due enantiomeri: quello che non interagisce (o interagisce meno col selettore chirale) risulta essere meno rallentato nella sua migrazione elettroforetica in quanto presenta una carica netta positiva per un tempo maggiore; al contrario, l'enantiomero che sviluppa una interazione più forte col selettore di carica opposta, non presenta una carica netta positiva (o la presenta per un tempo nettamente inferiore) in quanto il selettore è carico negativamente.

DETERMINAZIONE DELL'EFFICACIA DEI KIT IMMUNOENZIMATICI

I designer drugs amfetamino-simili, come già accennato nella sezione introduttiva, sono tra le sostanze d'abuso più diffuse, specie tra le nuove generazioni. Si tratta di molecole che ben si adattano alle esigenze del mercato clandestino perché sono sufficienti delle piccole modificazioni strutturali per ottenere prodotti di fatto legali, ma con proprietà psicotrope paragonabili a quelle delle amfetamine "tradizionali". In Italia, così come in numerosi altri Paesi, una sostanza non si può considerare illecita finchè non viene esplicitamente iscritta nella Tabella Ministeriale degli stupefacenti. La diffusione di molecole simili ma non indicate in questi documenti è, pertanto, assolutamente legale e non perseguibile per legge (né dal punto di vista amministrativo né tantomeno penale).

Nell'ambito della medicina legale, della medicina del lavoro e della tossicologia forense, il campione biologico di un soggetto sospettato di aver assunto sostanze stupefacenti si analizza in prima istanza con tecniche colorimetriche qualitative (kit immunoenzimatici). Solo in caso di risultato positivo lo stesso campione viene analizzato con tecniche cromatografiche per avere una conferma del tipo di sostanza assunta ed, eventualmente, quantificarla. Quando si ha a che fare con "droghe storiche" come la cocaina, la cannabis, l'eroina, l'amfetamina, la metamfetamina e la MDMA questi kit assolvono ampiamente al loro compito in quanto i falsi negativi sono molto rari al di sopra dei valori di cut-off fissati per legge (valori che variano a seconda della molecola e delle matrici considerate), e gli eventuali falsi positivi vengono confutati dalle analisi successive. Il problema reale dovuto all'ampio utilizzo che si fa di questi dispositivi è legato al fatto che la diffusione clandestina di designer drugs è in continua evoluzione nel tentativo, da parte di chi produce e "spaccia" stupefacenti, di evadere le norme di legge. Se un campione biologico di un soggetto che ha assunto una di queste nuove molecole viene analizzato con questi kit, darà con buone probabilità un risultato negativo.

Il problema principale è dovuto all'alta specificità del meccanismo di rivelazione: si tratta di un sistema antigene/anticorpo. Sono sufficienti piccole modificazioni della molecola che si vuole rilevare perché questa non interagisca più con la molecola anticorpale con cui è stato fabbricato il kit, dando, quindi, un risultato negativo. La portata di questo problema è facilmente intuibile, soprattutto a livello clinico e tossicologico: spesso soggetti intossicati risultano negativi ai preliminari test di screening. In queste condizioni il personale che deve gestire l'emergenza non ha dati sufficienti per operare in modo corretto, in quanto non ha informazioni sulla sostanza assunta dal soggetto stesso.

In letteratura sono riportati numerosi studi che riguardano le caratteristiche e performance dei kit più comunemente utilizzati per sostanze d'abuso conosciute [**69**-**74**]. La maggior parte di questi studi riportano un buon accordo tra i risultati forniti da questi test di screening e le analisi di conferma. Purtroppo, però, sono stati effettuati ben pochi studi sulla capacità dei questi test di screening di determinare la presenza di nuove sostanze d'abuso nei campioni biologici. È molto importante avere un'idea di come i nuovi designer drugs interagiscano con i kit immunoenzimatici più diffusi. Per questo motivo, in questo lavoro si è deciso di testare 41 amfetamine (**Figura 30**) con 6 test di screening commercialmente disponibili e comunemente utilizzati nei laboratori di medicina legale, medicina del lavoro e tossicologia forense. I test di screening utilizzati sono il test EMIT® (II Plus Amphetamines assay, II Plus Ecstasy assay, Screen®7), SureStep™ e Instalert™ (per le analisi nella matrice urina) e Screen® Multi-Drug OFD e GIMA One Step Multi-Line Screen Test OFD (per le analisi nella matrice fluido orale).

Tra le amfetamine studiate, alcune sono già presenti nelle Tabelle Ministeriali. La loro diffusione è pertanto perseguibile penalmente.

EMIT

Per le prove con i test EMIT sono stati utilizzati i saggi EMIT® II Plus Amphetamines assay (AMP assay) e EMIT® II Plus Ecstasy assay (EX assay) (Siemens, Newark, DE), in accordo con le istruzioni fornite dal costruttore. Le misurazioni sono state effettuate automaticamente con un Siemens Viva-E drug testing system (Siemens, Newark, DE). È stata considerata la variazione dell'assorbanza a 340 nm nell'arco di 20 secondi di analisi; ogni analisi è stata ripetuta per 3 volte utilizzando un volume di campione di 6 µl. Così come consigliato dal produttore, prima delle analisi è stata effettuata la calibrazione dello strumento: sono stata analizzate soluzioni standard a concentrazione 0.0, 0.3, 0.5, 1.0 e 2.0 µg/ml di *d*-MA per il saggio AMP e 0.0, 0.15, 0.3, 0.5 e 1.0 µg/ml di *dl*-MDMA per il saggio EX. Le analisi sono state effettuate con campioni di urina fortificati con le singole molecole considerate per lo studio, alla concentrazione di 10 000, 5 000, 2 000, 1 000, 750 e 500 ng/ml.

KIT IMMUNOENZIMATICI

I kit utilizzati sono Screen® 7 (SCREEN ITALIA Srl, Perugia, Italia), InstAlertTM (Biosigma Srl, Venezia, Italia) e SureStepTM (Alere Srl, Milano, Italia) per la matrice urina, e Screen® Multi-Drug OFD (SCREEN ITALIA Srl, Perugia, Italia) e GIMA One Step Multi-Line Screen Test OFD (GIMA Spa, Gessate, Milano, Italia) per la matrice saliva. Si tratta di test "multi-drug" che verificano la presenza di diverse sostanze contemporaneamente (tra cui amfetamina e metamfetamina;

l'ecstasy viene individuata solo dai kit per la matrice urina). L'unico test "singolo" è lo Sure stepTM, che è in grado di identificare una sostanza per volta (strisce singole); è anch'esso specifico per l'amfetamina, per la metamfetamina o per l'ecstasy.

Questi test si basano sul principio del legame competitivo: il farmaco, se presente nella matrice biologica, compete con il rispettivo antigene per il sito di legame antigene/anticorpo presente sulla molecola anticorpale. Se il farmaco target è presente nella matrice ad una concentrazione più bassa del suo cut-off (ossia il limite determinabile con questa specifica tecnica), non è in grado di saturare il sito di legame sul suo specifico anticorpo e il test dà un risultato negativo. Le misurazioni vengono effettuate senza l'utilizzo di strumenti. I campioni di urina e di saliva vengono raccolti in contenitori puliti e asciutti, ed analizzati a temperatura ambiente (25°C) entro un'ora dalla raccolta della matrice. I kit vengono immersi verticalmente nell'urina fortificata per circa 15 secondi e i risultati vengono letti dopo 7 minuti. I kit per l'analisi della saliva presentano un'estremità spugnosa che viene immersa nella matrice fortificata fino a saturarla completamente, e i risultati vengono letti dopo 10 minuti. L'assenza di o la presenza di una linea colorata, anche se molto sbiadita, nella zona "TEST" del kit indica un risultato rispettivamente positivo o negativo; la presenza di una linea colorata nella zona "CONTROLLO" del kit è invece necessaria per considerare validi sia i risultati positivi che quelli negativi. Ogni analisi è stata ripetuta in triplicato (n=3).

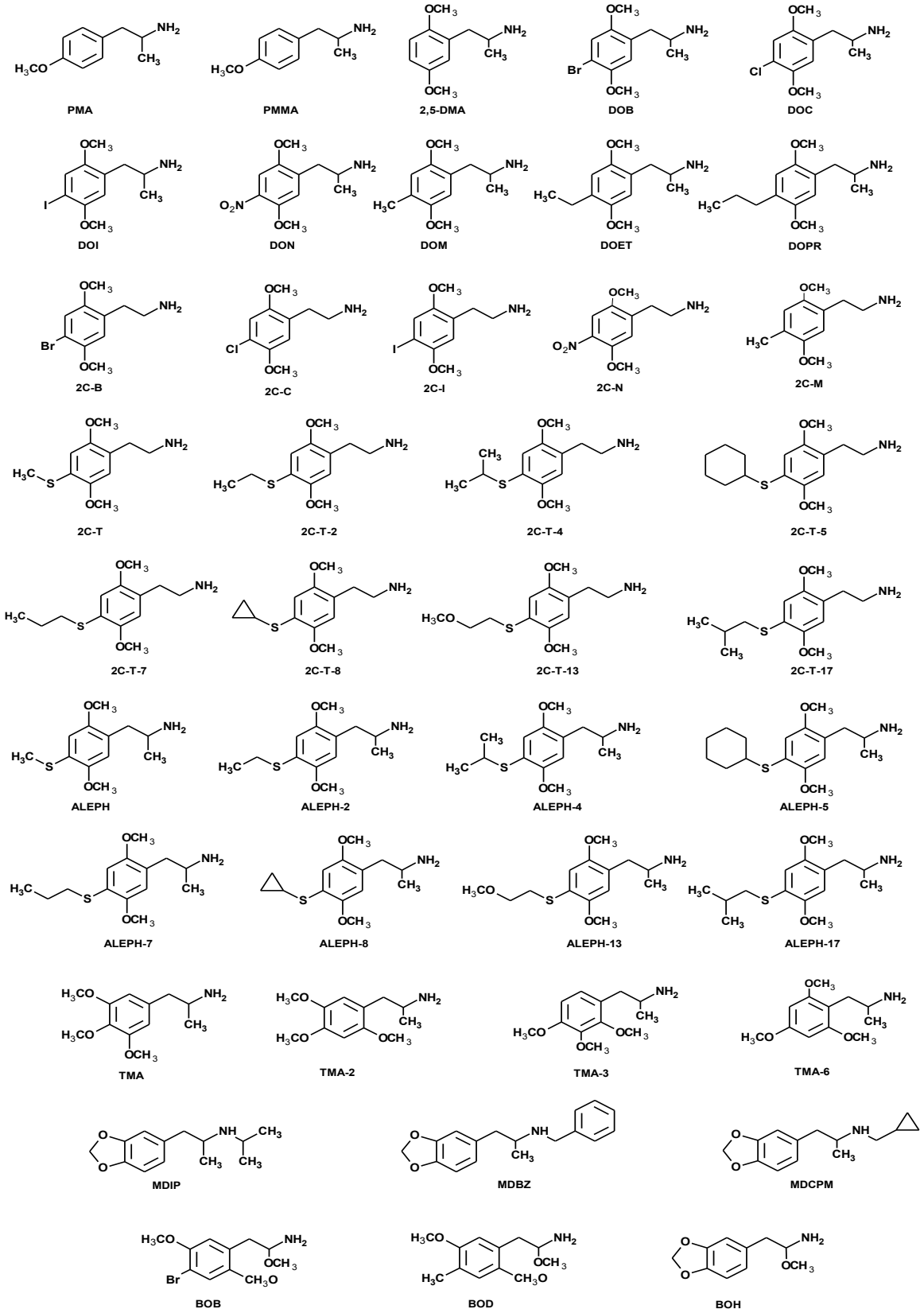
CALCOLO DELLA CROSS REATTIVITÁ

La cross reattività viene in ogni caso calcolata (sia per i kit EMIT che per tutti gli altri kit immunoenzimatici) secondo la seguente equazione, dove $C_{cut\text{-}off}$ è la concentrazione della sostanza analizzata necessaria per produrre un risultato positivo e "cut-off" è la minima concentrazione dell'analita target per quale è stato progettato il kit, sufficiente a dare un risultato positivo (500ng/ml per l'urina e 50ng/ml per la saliva, sia per l'amfetamina che per la metamfetamina che per l'ecstasy).

$$\% \text{ Cross Reattività} = \frac{\text{cutoff}}{C_{\text{cutoff}}} \times 100$$

Figura 30

Designer drugs oggetto di studio



EMIT [**121**]

Nella **Tabella 14** sono riportati i profili di cross reattività delle 41 amfetamine che sono state testate sia con il saggio per l'amfetamina (AMP) che con il saggio per l'ecstasy (EX). Si può evidenziare come il saggio AMP abbia mostrato la capacità di rilevare (seppure spesso con valori di cross-reattività molto bassi) 7 delle amfetamine testate, e in particolare la PMA, la, PMMA, la TMA-6, la MDIP, la MDBZ e la MDCPM.

Le 2,5-dimetossiamfetamine e le 2,5-dimetossifeniletiamine, che costituiscono la famiglia più diffusa di questo genere di designer drugs, non hanno mostrato alcuna cross-reattività alle concentrazioni utilizzate (fino a 10 000 ng/ml).

Gli analoghi dell'MDMA (MDIP, MDBZ, MDCPM e BOH) hanno mostrato una notevole cross-reattività con il saggio EX, e una bassa rilevabilità con il saggio AMP. Ciò è con tutta probabilità dovuto alla loro similarità strutturale con la molecola target per cui è stato progettato il saggio EX. Tutte queste molecole, infatti, come la 3,4-metilendiossimetamfetamina, presentano in sostituente 3,4-metilendiossi sull'anello aromatico. L'MDCPM ha mostrato una cross-reattività = 100, il che significa che è sufficiente una concentrazione di 500 ng/ml per produrre un risultato positivo.

La PMA e la PMMA, gli analoghi *para*-sostituiti con un gruppo metossilico dell'amfetamina e della metamfetamina, cross-reagiscono sia con il saggio AMP che con il saggio EX, ma con una intensità opposta.

Ricapitolando, solo 7 delle 41 amfetamine testate possono rilevate con almeno uno dei test utilizzati. In tutti gli altri casi (cross-reattività < 5) concentrazioni di 10 000 ng/ml non sono state sufficienti per produrre un risultato positivo.

Tabella 14

Profilo di cross-reattività degli analiti target con il saggio EMIT®

Analita	AMP	EX
p-Metossiamfetamina (PMA)	**10**	**5**
p- Metossimetamfetamina (PMMA)	**5**	**10**
2,5-Dimetossiamfetamina (2,5-DMA)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-bromoamfetamina (DOB)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-cloroamfetamina (DOC)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-etilamfetamina (DOET)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-iodoamfetamina (DOI)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metilamfetamina (DOM)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-nitroamfetamina (DON)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-propilamfetamina (DOPR)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-bromofeniletilamina (2C-B)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-clorofeniletilamina (2C-C)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-iodofeniletilamina (2C-I)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-nitrofeniletilamina (2C-N)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metilfeniletilamina (2C-M)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metiltiofeniletilamina (2C-T)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-etiltiofeniletilamina (2CT-2)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-isopropiltiofeniletilamina (2CT-4)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-cicloesiltiofeniletilamina (2CT-5)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*n*-propiltiofeniletilamina (2CT-7)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-ciclopropilmetiltiofeniletilamina (2CT-8)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-(2-metossietil)tiofeniletilamina (2CT-13)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*i*-butiltiofeniletilamina (2CT-17)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metiltioamfetamina (ALEPH)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-etiltioamfetamina (ALEPH-2)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*i*-propiltioamfetamina (ALEPH-4)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-cicloesiltioamfetamina (ALEPH-5)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*n*-propiltioamfetamina (ALEPH-7)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-ciclopropilmetiltioamfetamina (ALEPH-8)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-(2-metossietil)tioamfetamina (ALEPH-13)	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-isobutiltioamfetamina (ALEPH-17)	<5	<5
3,4,5-Trimetossiamftamina (TMA)	<5	<5
2,4,5-Trimetossiamfetamina (TMA-2)	<5	<5
2,3,4-Trimetossiamfetamina (TMA-3)	<5	<5
2,4,6-Trimetossiamfetamina (TMA-6)	**10**	<5
3,4-Metilendiossi-*N*-isopropilamfetamina (MDIP)	**25**	**67**
3,4-Metilendiossi-*N*-benzilamfetamina(MDBZ)	**50**	**67**
3,4-Metilendiossi-*N*-ciclopropilmetilamfetamina (MDCPM),	**50**	**100**
2-(3,4-Metilendiossifenil)-2-metossietilamina (BOH),	<5	**10**
2-(4-Bromo-2,5-dimetossifenl)-2-metossietilamina (BOB)	<5	<5
2-(2,5-Dimetossi-4metilfenil)-2-metossietilamina (BOD)	<5	<5

KIT IMMUNOENZIMATICI MATRICE URINA [**122**]

Oltre che con i saggio EMIT®, le stesse 41 amfetamine sono state saggiate con tre kit immunoenzimatici messi a punto per il rinvenimento di una serie di sostanze illecite nell'urina. Si tratta dei kit Screen®7, SureStep™ e Instalert™. Tutti e tre hanno fornito dati sovrapponibili, con minime variazioni (**Tabelle 15**, **16** e **17**). Anche in questo caso la PMA e la PMMA hanno dimostrato una buona cross-reattività con il saggio AMP (PMA con una cross-reattività pari a 100, PMMA con una cross-reattività 10 volte inferiore). Riguardo invece il saggio MET, la PMMA è l'unica delle 41 amfetamine testate a fornire un risultato positivo. Inoltre, la PMMA ha dimostrato una cross-reattività, seppur molto bassa (=5) anche con il saggio MDMA. Si tratta dell'unica molecola analizzata che ha fornito risultati positivi con tutti i test utilizzati.

Le uniche molecole 2,5-dimetossi sostituite che hanno dato un risultato positivo sono la 2,5-DMA, la DOB e la DOC.

Riassumendo, le amfetatamine che hanno mostrato una certa cross-reattività con il saggio AMP sono la PMA, la PMMA, la 2,5-DMA, la DOB, la DOC e la TMA-3. Per alcune di queste si è registrato un valore di cross-reattività molto basso, in quanto hanno fornito un risultato positivo solo a concentrazioni molto elevate (5 000 ng/ml per la PMMA e 10 000 ng/ml per la DOB).

Delle quattro molecole recanti un sostituente 3,4-metilendiossi (MDIP, MDBZ, MDCPM, BOH), solo 3 (MDIP, MDBZ ed MDCPM) hanno mostrato una buona reattività con il saggio MDMA. Si tratta di derivati N-sostituiti (al contrario di BOH), quindi in questo caso è lecito pensare che anche questa caratteristica strutturale sia fondamentale per dare un risultato positivo. La MDCPM in particolare ha fornito valori di cross-reattività molto alta (250 con Screen 7 e 500 con Instalert, che corrispondono a concentrazioni di 200 e 100 ng/ml, concentrazioni, queste, molto più basse del cut-off fissato per la MDMA. La BOH, che non presenta alcun sostituente sull'azoto della catena laterale, non reagisce con nessuno dei kit utilizzati.

Tutte le altre amfetamine hanno dato risultati negativi alla concentrazione di 10 000 ng/ml.

Tabella 15

Profilo di cross reattività degli analiti target con Screen®7 test

Analita	% Cross-reattività		
	AMP	MET	MDMA
p-Metossiamfetamina (PMA)	**100**	<5	<5
p- Metossimetamfetamina (PMMA)	**10**	**100**	**5**
2,5-Dimetossiamfetamina (2,5-DMA)	**50**	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-bromoamfetamina (DOB)	**5**	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-cloroamfetamina (DOC)	**33**	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-etilamfetamina (DOET)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-iodoamfetamina (DOI)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metilamfetamina (DOM)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-nitroamfetamina (DON)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-propilamfetamina (DOPR)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-bromofeniletilamina (2C-B)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-clorofeniletilamina (2C-C)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-iodofeniletilamina (2C-I)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-nitrofeniletilamina (2C-N)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metilfeniletilamina (2C-M)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metiltiofeniletilamina (2C-T)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-etiltiofeniletilamina (2CT-2)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-isopropiltiofeniletilamina (2CT-4)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-cicloesiltiofeniletilamina (2CT-5)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*n*-propiltiofeniletilamina (2CT-7)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-ciclopropilmetiltiofeniletilamina (2CT-8)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-(2-metossietil)tiofeniletilamina (2CT-13)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*i*-butiltiofeniletilamina (2CT-17)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metiltioamfetamina (ALEPH)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-etiltioamfetamina (ALEPH-2)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*i*-propiltioamfetamina (ALEPH-4)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-cicloesiltioamfetamina (ALEPH-5)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*n*-propiltioamfetamina (ALEPH-7)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-ciclopropilmetiltioamfetamina (ALEPH-8)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-(2-metossietil)tioamfetamina (ALEPH-13)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-isobutiltioamfetamina (ALEPH-17)	<5	<5	<5
3,4,5-Trimetossiamftamina (TMA)	<5	<5	<5
2,4,5-Trimetossiamfetamina (TMA-2)	<5	<5	<5
2,3,4-Trimetossiamfetamina (TMA-3)	**33**	<5	<5
2,4,6-Trimetossiamfetamina (TMA-6)	<5	<5	<5
3,4-Metilendiossi-*N*-isopropilamfetamina (MDIP)	<5	<5	**5**
3,4-Metilendiossi-*N*-benzilamfetamina(MDBZ)	<5	<5	**20**
3,4-Metilendiossi-*N*-ciclopropilmetilamfetamina (MDCPM)	<5	<5	**250**
2-(3,4-Metilendiossifenil)-2-metossietilamina (BOH),	<5	<5	<5
2-(4-Bromo-2,5-dimetossifenl)-2-metossietilamina (BOB)	<5	<5	<5
2-(2,5-Dimetossi-4metilfenil)-2-metossietilamina (BOD)	<5	<5	<5

Tabella 16

Profilo di cross reattività degli analiti target con SureStep™ test

Analita	% Cross-reattività		
	AMP	MET	MDMA
p-Metossiamfetamina (PMA)	**100**	<5	<5
p- Metossimetamfetamina (PMMA)	**10**	**200**	**5**
2,5-Dimetossiamfetamina (2,5-DMA)	**50**	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-bromoamfetamina (DOB)	**5**	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-cloroamfetamina (DOC)	**33**	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-etilamfetamina (DOET)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-iodoamfetamina (DOI)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metilamfetamina (DOM)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-nitroamfetamina (DON)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-propilamfetamina (DOPR)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-bromofeniletilamina (2C-B)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-clorofeniletilamina (2C-C)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-iodofeniletilamina (2C-I)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-nitrofeniletilamina (2C-N)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metilfeniletilamina (2C-M)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metiltiofeniletilamina (2C-T)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-etiltiofeniletilamina (2CT-2)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-isopropiltiofeniletilamina (2CT-4)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-cicloesiltiofeniletilamina (2CT-5)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*n*-propiltiofeniletilamina (2CT-7)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-ciclopropilmetiltiofeniletilamina (2CT-8)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-(2-metossietil)tiofeniletilamina (2CT-13)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*i*-butiltiofeniletilamina (2CT-17)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metiltioamfetamina (ALEPH)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-etiltioamfetamina (ALEPH-2)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*i*-propiltioamfetamina (ALEPH-4)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-cicloesiltioamfetamina (ALEPH-5)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*n*-propiltioamfetamina (ALEPH-7)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-ciclopropilmetiltioamfetamina (ALEPH-8)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-(2-metossietil)tioamfetamina (ALEPH-13)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-isobutiltioamfetamina (ALEPH-17)	<5	<5	<5
3,4,5-Trimetossiamftamina (TMA)	<5	<5	<5
2,4,5-Trimetossiamfetamina (TMA-2)	<5	<5	<5
2,3,4-Trimetossiamfetamina (TMA-3)	**33**	<5	<5
2,4,6-Trimetossiamfetamina (TMA-6)	<5	<5	<5
3,4-Metilendiossi-*N*-isopropilamfetamina (MDIP)	<5	<5	**5**
3,4-Metilendiossi-*N*-benzilamfetamina(MDBZ)	<5	<5	**20**
3,4-Metilendiossi-*N*-ciclopropilmetilamfetamina (MDCPM)	<5	<5	**500**
2-(3,4-Metilendiossifenil)-2-metossietilamina (BOH),	<5	<5	<5
2-(4-Bromo-2,5-dimetossifenl)-2-metossietilamina (BOB)	<5	<5	<5
2-(2,5-Dimetossi-4metilfenil)-2-metossietilamina (BOD)	<5	<5	<5

Tabella 17

Profilo di cross reattività degli analiti target con InstAlert™ test

Analita	% Cross-reattività		
	AMP	MET	MDMA
p-Metossiamfetamina (PMA)	**100**	<5	<5
p- Metossimetamfetamina (PMMA)	**10**	**200**	**5**
2,5-Dimetossiamfetamina (2,5-DMA)	**50**	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-bromoamfetamina (DOB)	**5**	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-cloroamfetamina (DOC)	**33**	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-etilamfetamina (DOET)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-iodoamfetamina (DOI)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metilamfetamina (DOM)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-nitroamfetamina (DON)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-propilamfetamina (DOPR)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-bromofeniletilamina (2C-B)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-clorofeniletilamina (2C-C)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-iodofeniletilamina (2C-I)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-nitrofeniletilamina (2C-N)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metilfeniletilamina (2C-M)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metiltiofeniletilamina (2C-T)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-etiltiofeniletilamina (2CT-2)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-isopropiltiofeniletilamina (2CT-4)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-cicloesiltiofeniletilamina (2CT-5)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*n*-propiltiofeniletilamina (2CT-7)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-ciclopropilmetiltiofeniletilamina (2CT-8)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-(2-metossietil)tiofeniletilamina (2CT-13)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*i*-butiltiofeniletilamina (2CT-17)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-metiltioamfetamina (ALEPH)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-etiltioamfetamina (ALEPH-2)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*i*-propiltioamfetamina (ALEPH-4)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-cicloesiltioamfetamina (ALEPH-5)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-*n*-propiltioamfetamina (ALEPH-7)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-ciclopropilmetiltioamfetamina (ALEPH-8)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-(2-metossietil)tioamfetamina (ALEPH-13)	<5	<5	<5
2,5-Dimetossi-4-isobutiltioamfetamina (ALEPH-17)	<5	<5	<5
3,4,5-Trimetossiamftamina (TMA)	<5	<5	<5
2,4,5-Trimetossiamfetamina (TMA-2)	<5	<5	<5
2,3,4-Trimetossiamfetamina (TMA-3)	**33**	<5	<5
2,4,6-Trimetossiamfetamina (TMA-6)	<5	<5	<5
3,4-Metilendiossi-*N*-isopropilamfetamina (MDIP)	<5	<5	**5**
3,4-Metilendiossi-*N*-benzilamfetamina(MDBZ)	<5	<5	**20**
3,4-Metilendiossi-*N*-ciclopropilmetilamfetamina (MDCPM)	<5	<5	**500**
2-(3,4-Metilendiossifenil)-2-metossietilamina (BOH),	<5	<5	<5
2-(4-Bromo-2,5-dimetossifenl)-2-metossietilamina (BOB)	<5	<5	<5
2-(2,5-Dimetossi-4metilfenil)-2-metossietilamina (BOD)	<5	<5	<5

KIT IMMUNOENZIMATICI MATRICE FLUIDO ORALE [**123**]

I profili di cross-reattività delle 41 amfetamine analizzate sono riportati nelle **Tabelle 18 e 19**. I risultati dei due kit utilizzati sono assolutamente sovrapponibili, con minime variazioni che riguardano la PMA e la PMMA. Con il test Screen® Multi-Drug, la PMA ha mostrato una cross-reattività quattro volte inferiore rispetto all'amfetamina (cross-reattività = 25), mentre la PMMA ha una capacità di essere rilevata due volte e mezzo maggiore rispetto alla metamfetamina, che è la molecola target (cross-reattività = 250). I risultati ottenuti con il test GIMA hanno mostrato, come già accennato, minime differenze, fornendo una cross-reattività di 50 per la PMA e di 25 per la PMMA, che corrispondono a una concentrazione di 100 e 200 ng/ml, rispettivamente.
Le altre molecole, come si può vedere dai dati tabulati, hanno tutte una cross-reattività < 1, il che significa che concentrazioni di 5 000 ng/ml non sono state sufficienti per produrre un risultato positivo. Ciò dimostra chiaramente che nonostante questi kit siano assolutamente affidabili per quel che riguarda la determinazione della presenza nella saliva delle sostanze per cui son stati progettati, allo stesso tempo forniscono poche o nessuna garanzia se si ha a che fare con nuove molecole.

L'obbiettivo di questo studio era quello di valutare i profili di cross-reattività di 41 nuovi designer drugs amfetamino-simili con differenti test di screening comunemente utilizzati. I risultati si sono rivelati drammaticamente rivolti in un'unica direzione: una minima percentuale delle sostanze testate è effettivamente rilevabile nelle matrici biologiche, se queste vengono analizzate con i kit studiati. Il dato è ancora più preoccupante se si considera che alcune sostanze già ufficialmente riconosciute come illecite dalla legislazione italiana (DMA, DOET, DOM, 2C-B, 2C-I, 2C-T-2, 2C-T-7, TMA e TMA-2) e già apparse nel mercato clandestino, possono dare risultati negativi con i test di screening comunemente usati. Questi dati sono estremamente preziosi in campo forense e tossicologico, perché, routinariamente, un risultato negativo non viene approfondito con analisi di conferma. Per questa ragione, quando le circostanze fanno pensare che un determinato soggetto ha assunto delle sostanze, anche un risultato negativo ai test di screening dovrebbe essere studiato ulteriormente, con tecniche più precise e attendibili, come quelle cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa. È di fondamentale importanza che i mezzi a disposizione degli organi preposti alla sorveglianza e alla gestione delle emergenze, siano costantemente aggiornati, così come costantemente in evoluzione è il mercato clandestino che immette in circolazione nuovi designer drugs.

Tabella 18

Profilo di cross reattività degli analiti target con Screen® test

Analita	% Cross-reattività	
	AMP	MET
p-Metossiamfetamina (PMA)	**25**	<1
p- Metossimetamfetamina (PMMA)	<1	**250**
2,5-Dimetossiamfetamina (2,5-DMA)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-bromoamfetamina (DOB)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-cloroamfetamina (DOC)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-etilamfetamina (DOET)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-iodoamfetamina (DOI)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-metilamfetamina (DOM)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-nitroamfetamina (DON)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-propilamfetamina (DOPR)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-bromofeniletilamina (2C-B)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-clorofeniletilamina (2C-C)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-iodofeniletilamina (2C-I)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-nitrofeniletilamina (2C-N)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-metilfeniletilamina (2C-M)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-metiltiofeniletilamina (2C-T)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-etiltiofeniletilamina (2CT-2)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-isopropiltiofeniletilamina (2CT-4)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-cicloesiltiofeniletilamina (2CT-5)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-*n*-propiltiofeniletilamina (2CT-7)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-ciclopropilmetiltiofeniletilamina (2CT-8)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-(2-metossietil)tiofeniletilamina (2CT-13)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-*i*-butiltiofeniletilamina (2CT-17)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-metiltioamfetamina (ALEPH)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-etiltioamfetamina (ALEPH-2)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-*i*-propiltioamfetamina (ALEPH-4)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-cicloesiltioamfetamina (ALEPH-5)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-*n*-propiltioamfetamina (ALEPH-7)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-ciclopropilmetiltioamfetamina (ALEPH-8)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-(2-metossietil)tioamfetamina (ALEPH-13)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-isobutiltioamfetamina (ALEPH-17)	<1	<1
3,4,5-Trimetossiamftamina (TMA)	<1	<1
2,4,5-Trimetossiamfetamina (TMA-2)	<1	<1
2,3,4-Trimetossiamfetamina (TMA-3)	<1	<1
2,4,6-Trimetossiamfetamina (TMA-6)	<1	<1
3,4-Metilendiossi-*N*-isopropilamfetamina (MDIP)	<1	<1
3,4-Metilendiossi-*N*-benzilamfetamina(MDBZ)	<1	<1
3,4-Metilendiossi-*N*-ciclopropilmetilamfetamina (MDCPM)	<1	<1
2-(3,4-Metilendiossifenil)-2-metossietilamina (BOH),	<1	<1
2-(4-Bromo-2,5-dimetossifenl)-2-metossietilamina (BOB)	<1	<1
2-(2,5-Dimetossi-4metilfenil)-2-metossietilamina (BOD)	<1	<1

Tabella 19

Profilo di cross reattività degli analiti target con GIMA test

Analita	% Cross-reattività	
	AMP	MET
p-Metossiamfetamina (PMA)	**50**	<1
p- Metossimetamfetamina (PMMA)	<1	**25**
2,5-Dimetossiamfetamina (2,5-DMA)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-bromoamfetamina (DOB)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-cloroamfetamina (DOC)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-etilamfetamina (DOET)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-iodoamfetamina (DOI)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-metilamfetamina (DOM)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-nitroamfetamina (DON)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-propilamfetamina (DOPR)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-bromofeniletilamina (2C-B)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-clorofeniletilamina (2C-C)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-iodofeniletilamina (2C-I)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-nitrofeniletilamina (2C-N)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-metilfeniletilamina (2C-M)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-metiltiofeniletilamina (2C-T)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-etiltiofeniletilamina (2CT-2)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-isopropiltiofeniletilamina (2CT-4)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-cicloesiltiofeniletilamina (2CT-5)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-*n*-propiltiofeniletilamina (2CT-7)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-ciclopropilmetiltiofeniletilamina (2CT-8)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-(2-metossietil)tiofeniletilamina (2CT-13)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-*i*-butiltiofeniletilamina (2CT-17)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-metiltioamfetamina (ALEPH)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-etiltioamfetamina (ALEPH-2)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-*i*-propiltioamfetamina (ALEPH-4)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-cicloesiltioamfetamina (ALEPH-5)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-*n*-propiltioamfetamina (ALEPH-7)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-ciclopropilmetiltioamfetamina (ALEPH-8)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-(2-metossietil)tioamfetamina (ALEPH-13)	<1	<1
2,5-Dimetossi-4-isobutiltioamfetamina (ALEPH-17)	<1	<1
3,4,5-Trimetossiamftamina (TMA)	<1	<1
2,4,5-Trimetossiamfetamina (TMA-2)	<1	<1
2,3,4-Trimetossiamfetamina (TMA-3)	<1	<1
2,4,6-Trimetossiamfetamina (TMA-6)	<1	<1
3,4-Metilendiossi-*N*-isopropilamfetamina (MDIP)	<1	<1
3,4-Metilendiossi-*N*-benzilamfetamina(MDBZ)	<1	<1
3,4-Metilendiossi-*N*-ciclopropilmetilamfetamina (MDCPM)	<1	<1
2-(3,4-Metilendiossifenil)-2-metossietilamina (BOH),	<1	<1
2-(4-Bromo-2,5-dimetossifenl)-2-metossietilamina (BOB)	<1	<1
2-(2,5-Dimetossi-4metilfenil)-2-metossietilamina (BOD)	<1	<1

CONCLUSIONI

Il lavoro sviluppato nel triennio di dottorato ha avuto come filo conduttore l'analisi chimico-tossicologica di designer drugs amfetamino-simili nell'applicazione della tossicologia clinica e forense. I dati ottenuti sono potenzialmente molto preziosi nell'ambito della medicina legale e della tossicologia forense. Gli studi di separazione chirale, opportunamente approfonditi dal punto di vista quantitativo, possono fornire dati relativi all'eccesso enantiomerico di una determinata partita di "droga". La conoscenza della composizione enantiomerica di una sostanze di sintesi può rivelarsi importante dal punto di vista investigativo, in quanto fornisce indicazioni sulla via sintetica utilizzata, le quali potrebbero essere utili per trarre ulteriori informazioni sul laboratorio di origine. Un'applicazione *in vivo* degli stessi metodi, inoltre, permetterebbe di valutare un eventuale metabolismo stereospecifico. Gli studi di analisi multiresiduo riguardano anche la determinazione e la quantificazione di molecole di probabile imminente immissione nel mercato illecito e consentono di avere a disposizione delle metodologie analitiche sensibili e affidabili, utili a fornire un buon punto di partenza per il monitoraggio dell'evoluzione del black market, una sicurezza nella gestione delle emergenze cliniche e un apporto di non trascurabile importanza nel campo della tossicologia forense. Di assoluta utilità risultano anche i dati forniti dallo studio di cross-reattività poiché la quasi totalità delle molecole studiate non risulta rilevabile con i kit comunemente utilizzati. Questo studio evidenzia la irrimandabile necessità di aggiornare gli strumenti a disposizione degli organi preposti alla sorveglianza e alla gestione delle emergenze. Durante il triennio del dottorato la candidata ha prodotto sette papers [**112**,**115**,**116**,**121**,**122**,**124**,**125**], più uno attualmente under review [**123**]. Gli studi di separazione chirale hanno inoltre consentito di presentare un poster al convegno PBA 2013 [**126**].

BIBLIOGRAFIA

[1] Dorland's Medical Dictionary for Health Consumers. Elsevier Saunders, 2007

[2] The American Heritage® Medical Dictionary. Houghton Mifflin Company, 2004

[3] World Drug Report 2010, United Nations Office on Drugs and Crime

[4] Courtwright D. Cambridge, MA: Harvard University Press, 2001

[5] Christophersen AS. Toxicology Letters (2000) 112-113:127-131

[6] Kalant H. Canadian Medical Association *Jo*urnal (2001) 165:917-992

[7] Bogen IL, Haug KH, Myhre O, Fonnum F. Neurochemistry International (2003) 43:393-400

[8] Greer G. Advances (1985) 2:57-59

[9] Downing J. Journal of Psychoactive Drugs (1986) 18:335-340

[10] Gunn JA, Gurd MR. Journal Physiology (1940) 97:453-470

[11] Siegel RK. Journal of Psychoactive Drugs (1986) 18:349-354

[12] Mayer R, Zuccaro P, Pacifici R. Bollettino per le farmacodipendenze e l'alcoolismo (1999) ANNO XXII no 3

[13] Lawn JC. Federal Register (1986) 51: 21911-21912

[14] Tabelle ministeriali degli stupefacenti. Decreto Ministeriale dell'11 aprile 2006 (D.L. 272/2006, pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale n. 95 del 24-4-2006

[15] Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A. Progress in Neurobiology (2005) 75:406-433

[16] Nordahl TE, Salo R, Leamon M. Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences (2003) 15:317-325

[17] Kuczenski R, Segal DS, Cho AK, Melega W. Journal of Neuroscience (1995) 15:1308-1317

[18] Brown JM, Hanson GR, Fleckenstein AE. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (2001) 296:762-767

[19] Khoshbouei H, Wang H, Lechleiter JD, Javitch JA, Galli A. Journal of Biological Chemistry (2003) 278:12070-12077

[20] Mantle TJ, Tipton KF, Garrett NJ. Biochemical Pharmacology (1976) 25:2073-2077

[21] Mandell AJ, Morgan M. Nature (1970) 227:75-76

[22] Schmitz Y, Lee CJ, Schmauss C, Gonon F, Sulzer D. Journal of Neuroscience (2001) 21:5916-5924

[23] Saunders C, Ferrer JV, Shi L, Chen J, Merrill G, Lamb ME, Leeb-Lundberg LM, Carvelli L, Javitch JA, Galli A. Proceedings of the National Academy of Sciences USA (2000) 97:6850-6855

[24] Busto U, Bendayan R, Sellers EM. Clinical Pharmacokinetics (1989) 16:1-26

[25] Gambelunghe C, Marsili R, Aroni K, Bacci M, Rossi R. Journal of Forensic Sciences (2013) 58:270-278

[26] Hart CL, Ward AS, Haney M, Foltin RW, Fischman MW. Psychopharmacology (Berl) (2001) 157:75-81

[27] Zack M, Poulos CX. Current Drug Abuse Reviews (2009) 2:11-25

[28] Barr AM, Markou A. Neuroscience & Biobehavioral Reviews (2005) 29:675-706

[29] Barr AM, Markou A, Phillips AG. Trends in Pharmacological Sciences (2002) 23:475-482

[30] Smith LM, La Gasse LL, Derauf C, Grant P, Shah R, Arria A, Huestis M, Haning W, Strauss A, Della Grotta S, Liu J, Lester BM. Pediatrics (2006) 118:1149-1156

[31] Julien RM, Advokat CD, Comaty JE. Droghe e farmaci psicoattivi. Zanichelli, 2012

[32] Osservatorio Europeo delle Droghe e delle Tossicodipendenze. Relazione Europea sulla Drogha. Tendenze e sviluppi. Relazione annuale 2013

[33] Wohlfarth A, Weinmann W. Bioanalysis (2010) 2:965-979

[34] ODET – Osservatorio delle Droghe e delle Tossicodipendenze. Relazione annuale 2010

[35] Dipartimento per le Politiche Antidroga, Relazione sullo stato delle tossicodipendenze in Italia. Relazione annuale 2012

[36] Hibell B, Guttormsson U, Ahlström S, Balakireva O, Bjarnason T, Kokkevi A, Kraus L. European school survey on alcohol and other drugs. Substance Use Among Students in 36 European Countries. 2011 ESPAD Report

[37] King LA, Kicman AT. Drug Testing and Analysis (2011) 3:401-403

[38] Caldwell J, Hutt AJ, Fournel-Gigleux S. Biochemical Pharmacology (1988) 37:105-114

[39] Adams SS, Bresloff P, Mason CG. Journal of Pharmacy and Pharmacology (1976) 28:256-257

[40] Hashim NH, Khan SJ. Journal of Chromatography A (2011) 1218:4746-4754

[41] Mohr S, Taschwer M, Schimd MG. Chirality (2012) 24:486-492

[42] Parkes JD, Fenton GW. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry (1973) 36:1076-1081

[43] Arnold LE. Journal of Attention Disorders (2000) 3:200-211

[44] Iwata YT, Garcia A, Kanamori T, Inoue H, Kishi T, Lurie IS. Electrophoresis (2002) 23:1328-1334

[45] Mohr S, Piliaj S, Schimd MG. Electrophoresis (2012) 33:1624-1630

[46] Phinney KW, Sander LC. Analytical and Bioanalytical Chemistry (2004) 378:144-149

[47] Herráez-Hernández R, Campíns-Falcó P, Verdú-Andrés J. Journal of Biochemical and Biophysical Methods (2002) 54:147-167

[48] Herráez-Hernández R, Campíns-Falcó P, Tortajada-Genaro LA. Analyst (1998) 123:2131-2137

[49] Drake SJ, Morrison C, Smith F. Chirality (2011) 23:593-601

[50] Strano-Rossi S, Botrè F, Bermejo AM, Tabernero MJ. Forensic Science International (2009) 193:95-100

[51] Rasmussen LB, Olsen KH, Johansen SS. Journal of Chromatography B (2006) 842:136-141

[52] Wang SM, Wang TC, Giang YS. Journal of Chromatography B (2005) 816:131-143

[53] Huang YS, Liu JT, Lin LC, Lin CH. Electrophoresis (2003) 24:1097-1104

[54] Huang YS, Tsai CC, Liu JT, Lin CH. Electrophoresis (2005) 26:3904-3909

[55] Kim EM, Chung HS, Lee KJ, Kim HJ. Journal of Analytical Toxicology (2000) 24:238-244

[56] Rudaz S, Geiser L, Souverain S, Prat J, Veuthey JL. Electrophoresis (2005) 26:3910-3920

[57] Billiot E, Thibodeaux S, Shamsi S, Warner IM. Analytical Chemistry (1999) 71:4044-4049

[58] Fanali S. Journal of Chromatography A (2000) 875:89-122

[59] Okamoto Y, Kaida Y. Journal of Separation Science (1990) 10:708-712

[60] Kuhn R. Electrophoresis (1999) 20:2605-2613

[61] Fromming KH, Szejtli J. Cyclodextrins in Pharmacy, Kluwer Academic Publishers (1994)

[62] Drummer OH, Odell M. The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse. Arnold: London, 2001

[63] Pragst F, Balíková M. Clinica Chimica Acta (2006) 370:17-49

[64] Oliveira CDR, Roehsig M, Almeida RM, Rocha WL, Yonamine M. Current Pharmaceutical Analysis (2007) 3:95-109

[65] Cooper Gail AA, Kronstrand R, Kintz P. Forensic Science International (2012) 218:20-24

[66] Lee S, Park Y, Kim J, In S, Choi H, Chung Hn, Oh SM, Chung KH. Archives of Pharmacal Research (2011) 34:593-598

[67] Italian Decree "Legge 29 luglio 2010, n. 120. Disposizioni in materia di sicurezza stradale. Art. 33: Modifiche agli articoli 186 e 187 e introduzione dell'articolo186-bis del decreto legislativo n. 285 del 1992". (Italian Official Gazette No. 175/ 2010)

[68] Souza DZ, Boehl PO, Comiran E, Prusch DS, Zancanaro I, Fuentefria AM, Pechansky F, Duarte PC, De Boni RB, Fröehlich PE, Limberger RP. Therapeutic Drug Monitoring (2012) 34:98-109

[69] Strano-Rossi S, Castrignanò E, Anzillotti L, Serpelloni G, Mollica R, Tagliaro F, Pascali JP, di Stefano D, Sgalla R, Chiarotti M. Forensic Sci Int (2012) 221:70–76

[70] Pehrsson A, Blencowe T, Vimpari K, Impinen A, Gunnar T, Lillsunde P. International Journal of Legal Medicine (2011) 125:675-683

[71] Wille SM, Samyn N, Ramírez-Fernández Mdel M, De Boeck G. Forensic Science International (2010) 198:2-6

[72] Nakanishi K, Miki A, Zaitsu K, Kamata H, Shima N, Kamata T, Katagi M, Tatsuno M, Tsuchihashi H, Suzuki K. Forensic Science International (2012) 217:174-181

[73] Manchikanti L, Malla Y, Wargo BW, Fellows B. Pain Physician (2011) 14:175-187

[74] Leis HJ, Windischhofer WJ. Separation Science (2012) 35:3326-3331

[75] Mohr S, Weiß JA, Spreitz J, Schmid MG. Journal of Chromatography A (2012) 1269:352-359

[76] Djozan D, Farajzadeh MA, Sorouraddin SM, Baheri TJ. Journal of Chromatography A (2012) 1248:24-31

[77] Płotka JM, Morrison C, Adam D, Biziuk M. Analytical Chemistry (2012) 13:5625-5632

[78] Dobos A, Hidvégi E, Somogyi GP. Journal of Analytical Toxicology (2012) 36:340-344

[79] Nagai T, Kurosu A, Matsushima K, Maeda J, Tohei A, Yamauchi S, Hitosugi M, Tokudome SJ. Journal of Analytical Toxicology (2012) 36:96-105

[80] Kumazawa T, Hasegawa C, Hara K, Uchigasaki S, Lee XP, Seno H, Suzuki O, Sato K. Journal of Separation Sciences (2012) 35:726-733

[81] Kerrigan S, Banuelos S, Perrella L, Hardy B. Journal of Analytical Toxicology (2011) 35:459-469

[82] Kim JY, Cheong JC, Lee JI, Son JH, In MK. Journal of Forensic Sciences (2012) 57:228-233

[83] Souza DZ, Boehl PO, Comiran E, Mariotti KC, Pechansky F, Duarte PC, De Boni R, Froehlich PE, Limberger RP. Analytica Chimica Acta (2011) 696:67-76

[84] Gallardo E, Barroso M, Queiroz JA. Drug Testing and Analysis (2009) 1:109-115

[85] Schaefer N, Peters B, Schmidt P, Ewald AH. Analytical and Bioanalytical Chemistry (2013) 405:247-58

[86] Lua IA, Lin SL, Lin HR, Lua AC. Journal of Analytical Toxicology (2012) 36:575-581

[87] Middleberg RA, Homan J. Methods in Molecular Biology (2012) 902:105-114

[88] Lavagnini I, Magno F, Deraglia R, Traldi P. Quantitative applications of mass spectrometry, Wiley Ed. 2006

[89] Shulgin A, Shulgin A. Phikal-a chimical love story (I ediz, IV ristampa), Ed Transform 1998

[90] Package insert. SureStepTM One-step Test Strip (Urine) for AMP, MET and MDMA; Alere Srl, Milan, Italy.

[91] Package insert. InstAlertTM Multi-drug One Step Screen Test Panel (Urine) for COC/AMP500/MET500/THC/MTD/MDMA/MOP. Biosigma Srl, Venice, Italy.

[92] Package insert. Screen®7 Multi-drug One Step Screen Test Panel (Urine) for COC/AMP500/MET500/THC/MTD/MDMA/MOP. SCREEN ITALIA Srl, Perugia, Italy.

[93] Package insert. Screen® Multi-drug OFD Oral Fluid Drug Screen Device for AMP/COC/THC/MET/OPI/PCP. SCREEN ITALIA Srl, Perugia, Italy

[94] Package insert. GIMA One Step Multi-Line Screen Test OFD for AMP/COC/THC/MET/OPI/PCP. GIMA Spa, Gessate, Milan, Italy

[95] Mortier KA, Dams R, Lambert WE, De Letter EA, Van Calenbergh S, De Leenheer AP. Rapid Communication in Mass Spectrometry (2002) 16:865-870

[96] Bomann M, Guch I, Di Mare M. Journal of Organic Chemistry (1995) 60:5995-5996

[97] Hirano M, Yakabe S, Chikamori H, Clark J, Morimoto T. Journal of Chemical Research (1998) 308-309

[98] Journal of Medicinal Chemistry, 1970, vol. 13, n° 5

[99] Boatto G, Nieddu M, Carta A, Pau A, Palomba M, Asproni B, Cerri R. Journal of Chromatography B (2005) 814:93-98

[100] Boatto G, Nieddu M, Pirisi MA, Dessì G. Rapid Communication in Mass Spectrometry (2007) 21:3716-3720

[101] Nieddu M, Boatto G, Carta A, Sanna A, Pisano M. Biomedical Chromatography (2005) 19:737-742

[102] Nieddu M, Boatto G, Sini L, Dessì G. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies (2007) 30:431–438

[103] Nieddu M, Boatto G, Pirisi MA, Dessì G. Rapid Communication in Mass Spectrometry (2010) 24:2357-62

[104] Nieddu M, Boatto G, Dessì G. Journal of Chromatography B (2007) 852:578-81

[105] Pascale B. Tesi di Dottorato dal titolo "Determinazione di sostanze d'abuso in matrici biologche", Scuola di Dottorato in Ambiente, Prevenzione e Medicina Pubblica (XXII ciclo), Indirizzo in Sienze Biologiche Forensi

[106] Peters FT, Maureer HH. Accreditation and Quality Assurance (2002) 7:441-449

[107] Taverniers I, de Loose M, Van Bockstaele E. Trends in Analytical Chemistry (2004) 23:535

[108] Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Forensic Science International (2007) 165:216

[109] Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL. Journal of Chromatography A (2004) 1058: 61-66

[110] Annesley T. Clinical Chemistry (2003) 49: 1041-1044

[111] Maureer HH. Analtical and Bioanalytical Chemistry (2007) 388: 1315-1325

[112] Nieddu M, Burrai L, Pirisi MA, Carta A, Briguglio I, Dessì G, Boatto G. Forensic Toxicology (2013) 31:204-211

[113] Nandakumara S, Menonb S, Shailajanc S. Biomedical Chromatography (2013) 27: 318-326

[114] Ensslin HK, Kovar KA, Maurer HH. Journal of Chromatography B 683:189–197

[115] Boatto G, Pirisi MA, Burrai L, Baralla E, Demontis MP, Varoni MV, Nieddu M. Forensic Toxicology DOI 10.1007/s11419-013-0204-7

[116] Burrai L, Nieddu M, Pirisi MA, Carta A, Briguglio I, Boatto G. Chirality (2013) 25:617-621

[117] Morin P, Dreux M, Usse S, Viaud MC, Guillaumet G. Electrophoresis (1999) 20:2630-2637

[118] Fanali S, Bocek P. Journal of Chromatography (1991) 545:437–444

[119] Van Eeckhaut A, Detaevernier MR, Crommen J, Michotte Y. Journal of Separation Science (2004) 27:21-27

[120] Ferguson PD, Goodall DM, Loran JS. Journal of Chromatography A (1996) 20:25-35

[121] Nieddu M, Trignano C, Burrai L, Pirisi MA, Boatto G. Forensic Toxicology (2013) 31:133–137

[122] Nieddu M, Burrai L, Trignano C, Boatto G. Forensic Toxicology DOI 10.1007/s11419-013-0198-1

[123] Article submitted to Legal Medicine (under review)

[124] Pirisi MA, Nieddu M, Burrai L, Carta A, Briguglio I, Baralla E, Demontis MP, Varoni MV, Boatto G. Forensic Toxicology (2013) 31:197-203

[125] Boatto G, Trignano C, Burrai L, Spanu A, Nieddu M. Effects of Homoeopathic Mother Tinctures on Breath Alcohol Testing. Journal of Forensic Sciences. In press

[126] Burrai L, Nieddu M, Boatto G. 24° International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA) Bologna (Italy) June 30- July 3, 2013, P2-35

INDICE

1 …….INTRODUZIONE

4 …….ASPETTI FARMACOLOGICI DELLE AMFETAMINE

6 …….DIFFUSIONE DELLE AMFETAMINE

8 …….CHIRALITÁ

8 …….CHIRALITÁ NEI SISTEMI BIOLOGICI

10 …….L'ELETTROFORESI CAPILLARE NELLE SEPARAZIONI CHIRALI

13 …….DETERMINAZIONE DELLE AMFETAMINE NELLE MATRICI BIOLOGICHE

15 …….TEST DI SCREENING

17 …….SAGGI DI CONFERMA E QUANTIFICAZIONE

19 …….SCOPO DEL LAVORO

23 …….MATERIALI E METODI

24 …….EMIT

24 …….KIT IMMUNOENZIMATICI

25 …….LC-MS

25 …….LC-MS/MS

25 …….ELETTROFORESI CAPILLARE

26 …….ESPERIMENTI *IN VIVO*

27 …….PARTE CHIMICA

27 …….SINTESI MDAs

30 …….SINTESI BOX

33 …….SINTESI DELLO STANDARD INTERNO

34 …….SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DELLE MDAs

39 …….SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DELL BOX

48 …….SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DELLO STANDARD INTERNO

50 …….PARTE ANALITICA

52 …….VALIDAZIONE DI UN METODO ANALITICO

54 …….ANALISI MULTIRESIDUO MDAs

54 …….STRUMENTAZIONE

54 …….SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

54 …….METODO DI ACQUISIZIONE IN MASSA E VALIDAZIONE

62 …….APPLICAZIONE *IN VIVO*

64 …….ANALISI MULTIRESIDUO BOX

64 …….STRUMENTAZIONE

64 …….SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

64 …….METODO DI ACQUISIZIONE IN MASSA E VALIDAZIONE

73 …….APPLICAZIONE *IN VIVO*

75 …….SEPARAZIONE ENANTIOMERICA DI 13 NUOVI DESIGNER DRUGS

75 …….STRUMENTAZIONE

77 …….STUDI DI SEPARAZIONE ENANTIOMERICA

84 …….DETERMINAZIONE DELL'EFFICACIA DEI KIT IMMUNOENZIMATICI

86 …….CALCOLO CROSS REATTIVITÁ

88 …….EMIT

90 …….KIT IMMUNOENZIMATICI MATRICE URINA

94 …….KIT IMMUNOENZIMATICI MATRICE FLUIDO ORALE

97 …….CONCLUSIONI

98 …….BIBLIOGRAFIA