



NPS: NUOVE STRATEGIE ANALITICHE PER NUOVE SOSTANZE

Le Nuove Sostanze Psicoattive (NPS) rappresentano una sfida crescente per la salute pubblica. La spettrometria di massa, attraverso strumentazioni ad alta risoluzione (HRMS), rappresenta la tecnica d'elezione per la loro identificazione. Il Molecular Networking, che permette di raggruppare gli spettri di massa in famiglie spettrali, consente di migliorare le potenzialità identificative della HRMS.

Le Nuove Sostanze Psicoattive (NPS) rappresentano una minaccia crescente per la salute pubblica, nazionale e internazionale. Sono sostanze di sintesi o semi-sintesi, ottenute attraverso semplici modifiche strutturali a carico delle droghe tradizionali, per questo motivo riescono a eludere molto facilmente i controlli, riuscendo a diffondersi rapidamente all'interno della società [1]. La loro diffusione è stata agevolata dalla presenza di Internet (in particolare *dark web* o *deep web*), che ha reso

queste sostanze accessibili come mai prima, raggiungendo un picco durante il periodo di crisi pandemica affrontato all'inizio del 2020 [2, 3]; la scarsa conoscenza attuale riguardo le loro caratteristiche tossicologiche, soprattutto per le NPS di nuova generazione, desta molta preoccupazione [4]. Il consumo delle NPS ha avuto inizio negli anni Ottanta, spingendo gli Stati Uniti d'America a introdurre il "Federal Analog Act", che mirava a monitorare sostanze strutturalmente simili a droghe

controllate (solo se destinate al consumo umano) [5], però è solo dai primi anni del 2000 che l'Agenzia Antidroga dell'Unione Europea (EUDA) ha cominciato a registrare la comparsa di tali sostanze sul territorio europeo.

Ad oggi sono state identificate 1392 NPS a livello globale; nell'ultimo report pubblicato dall'EUDA [6] è stata segnalata la comparsa di 26 nuove NPS nel 2023 e altre 47 nel 2024, mostrando un trend in crescita che non mostra cen-

ni di arresto (Fig. 1). Le NPS possono essere classificate in funzione dell'effetto farmacologico, dell'origi-

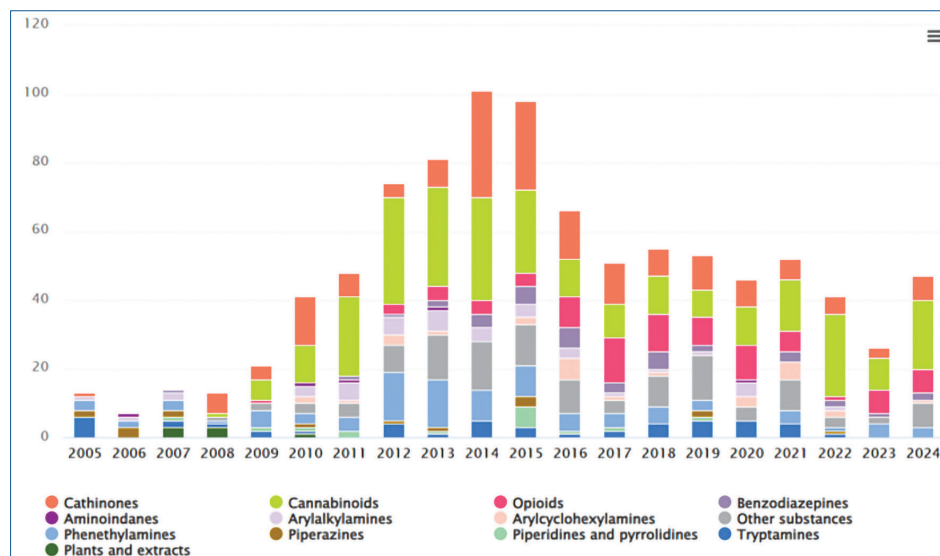


Fig. 1 - Numero di nuove sostanze psicoattive segnalate per la prima volta al sistema di allarme rapido dell'UE, per categoria, 2005-2024. Fonte: EUDA (Agenzia dell'Unione europea sulle droghe), European Drug Report 2025: Trends and Developments. Riprodotto sotto licenza CC BY 4.0

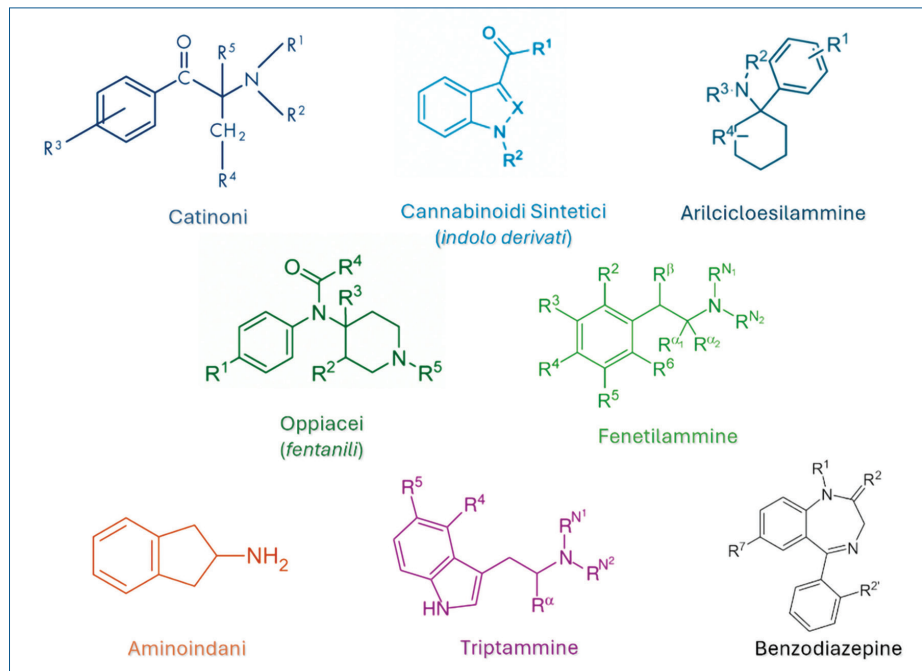


Fig. 2 - Struttura base delle principali classi di Nuove Sostanze Psicoattive

ne, della situazione giuridica o della loro struttura chimica [1, 4]. L'Ufficio delle Nazioni Unite contro la Droga e il Crimine (UNODC) ha identificato 15 famiglie differenti. Tra queste sono presenti i cannabinoidi sintetici, che attualmente risultano essere la classe più diffusa [7], molto popolari anche tra i giovani [8], i nitazeni e i derivati del fentanil, i quali hanno un effetto farmacologico simile a quello dell'oppio, per questo motivo rientrano nella grande famiglia degli oppioidi sintetici. Questa classe, soprattutto negli ultimi anni, rappresenta una grande minaccia in quanto è responsabile della maggior parte dei decessi dovuti all'abuso di droghe di sintesi. Le principali classi di NPS sono rappresentate in Fig. 2.

Il mercato delle NPS è estremamente rapido, per questo motivo è necessario sviluppare dei protocolli analitici in grado di stare al passo con questa rapida evoluzione.

La cromatografia, sia liquida (LC) che gassosa (GC), rappresenta la metodica analitica più utilizzata per la loro analisi, solitamente abbinata alla spettrometria di massa (MS) [9]. In particolare, la LC-MS rappresenta la tecnica d'elezione per l'analisi di queste sostanze [10], consentendo di ottenere sia analisi quantitative estremamente af-

fidabili, con strumentazioni a bassa risoluzione, sia analisi di caratterizzazione strutturale con strumentazioni ad alta risoluzione come l'Orbitrap e il Tempo di Volo (TOF) [11]. Nel primo caso, si applicano analisi di tipo *target* (mirate); si utilizzano strumentazioni, come il triplo quadrupolo, progettate per massimizzare la sensibilità e la selettività nel rilevamento e nella quantificazione di un numero limitato di sostanze note. Con il secondo tipo di strumentazione, invece, è possibile effettuare analisi *untarget* (non mirate), indispensabili per affrontare la ricerca di sostanze senza avere informazioni a

priori sulla loro struttura. Lo sviluppo di approcci *untarget* mediante HRMS è necessario se si vuole riuscire a competere con il mercato illecito.

La spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) è estremamente utile per l'analisi qualitativa perché offre la possibilità di misurare la massa di una molecola con estrema accuratezza, spesso fino alla quarta cifra decimale. La massa esatta è una proprietà intrinseca che consente di determinare la formula chimica elementare di una sostanza completamente sconosciuta; insieme agli spettri di frammentazione informativi, permette la caratterizzazione strutturale di nuovi composti. Tuttavia, tutte le potenzialità dell'HRMS rischiano di perdersi senza gli strumenti computazionali giusti per l'analisi dei dati. La mole di informazioni generate rende infatti quasi impossibile l'identificazione di nuove molecole senza l'ausilio di software specifici in grado di 'deconvolvere' gli spettri e di estrarre le informazioni utili in modo rapido e automatizzato (Fig. 3). I software analitici (proprietary o *open-source*) identificano i segnali significativi nel tempo e nella massa, separandoli dal rumore di fondo. Questo processo è chiamato *peak picking* e mira a identificare le masse esatte di tutti gli ioni presenti nel campione ad ogni tempo di

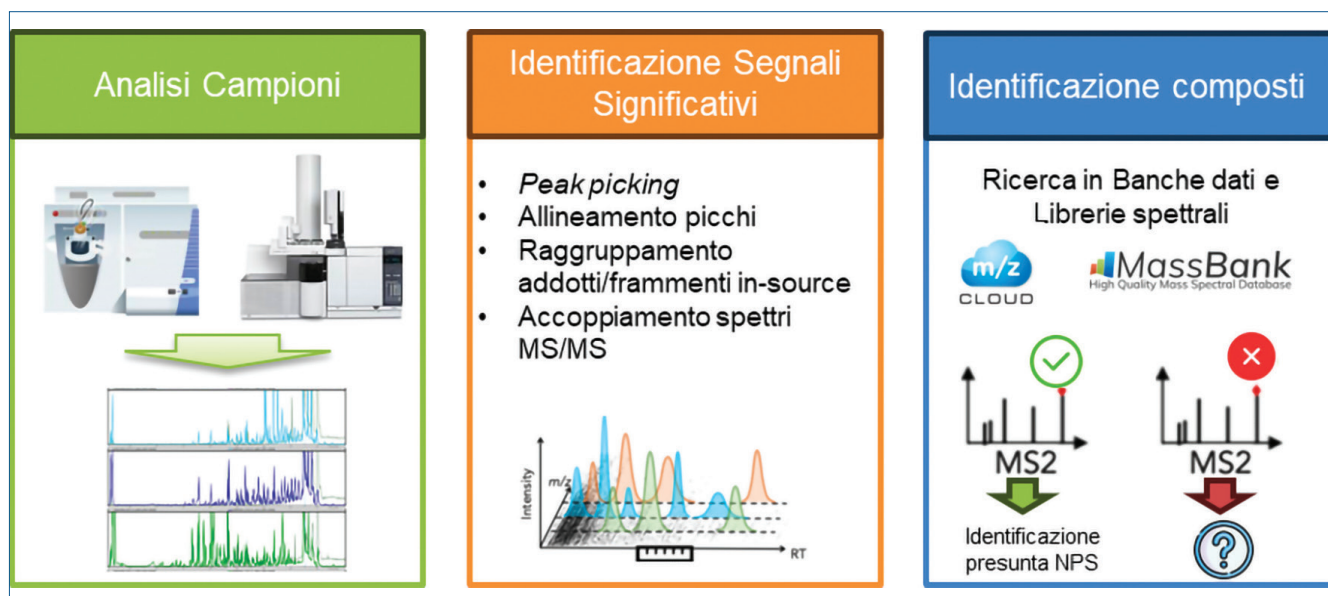


Fig. 3 - Flusso di lavoro di un'analisi LC-HRMS a partire dall'acquisizione dei campioni all'identificazione di molecole di interesse

ritenzione. Quando vengono utilizzate modalità di acquisizione MS/MS ad ogni ione precursore viene associato anche uno spettro di frammentazione, ricco di informazioni preziose per risalire alla struttura di molecole sconosciute. Gli spettri MS/MS possono essere utilizzati per ricerche nei database al fine di riconoscere le molecole presenti nel campione. Le difficoltà nascono quando sono presenti sostanze inattese, il cui spettro non è presente nelle banche dati.

Strumenti computazionali innovativi come il Molecular Networking (MN), offrono la possibilità di poter individuare una nuova sostanza per similitudine strutturale con molecole già note [12]. Data

la tendenza delle NPS ad appartenere a classi chimiche ben definite, questo approccio si rivela particolarmente efficace per rilevare molecole emergenti che sono chimicamente correlate a quelle già conosciute, accelerando il processo di annotazione.

Introdotta nel 2012 [13], il MN è stato impiegato per l'analisi di sostanze psicoattive solo recentemente [12, 13]. Questa strategia, seppure ancora poco utilizzata per questa classe di composti, si sta già rivelando efficace, offrendo interessanti potenzialità anche per determinare le strutture di possibili nuove NPS, basandosi sulla differenza di massa dello ione precursore tra i nodi delle reti molecolari [12].

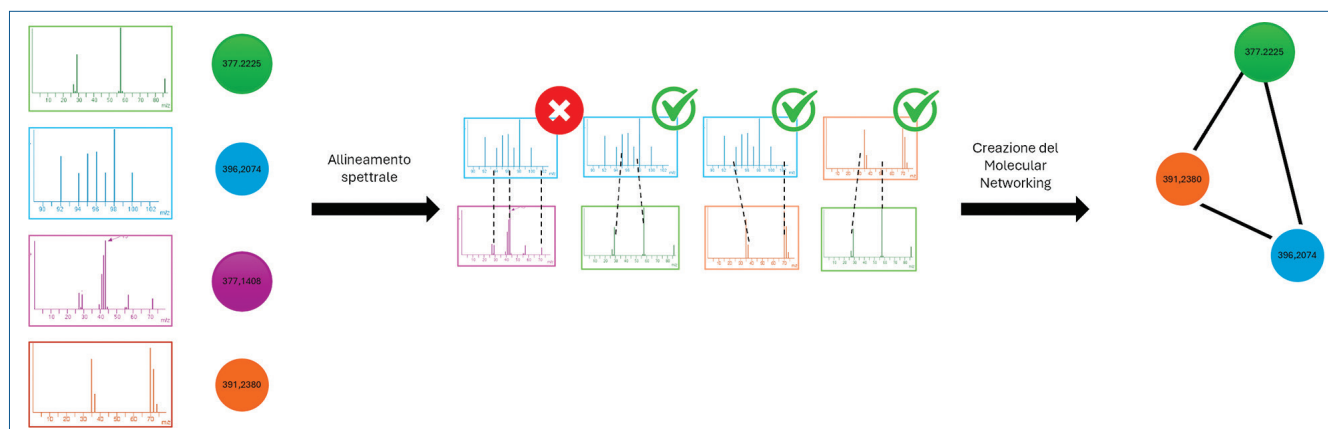


Fig. 4 - Esempio di workflow analitico con MN

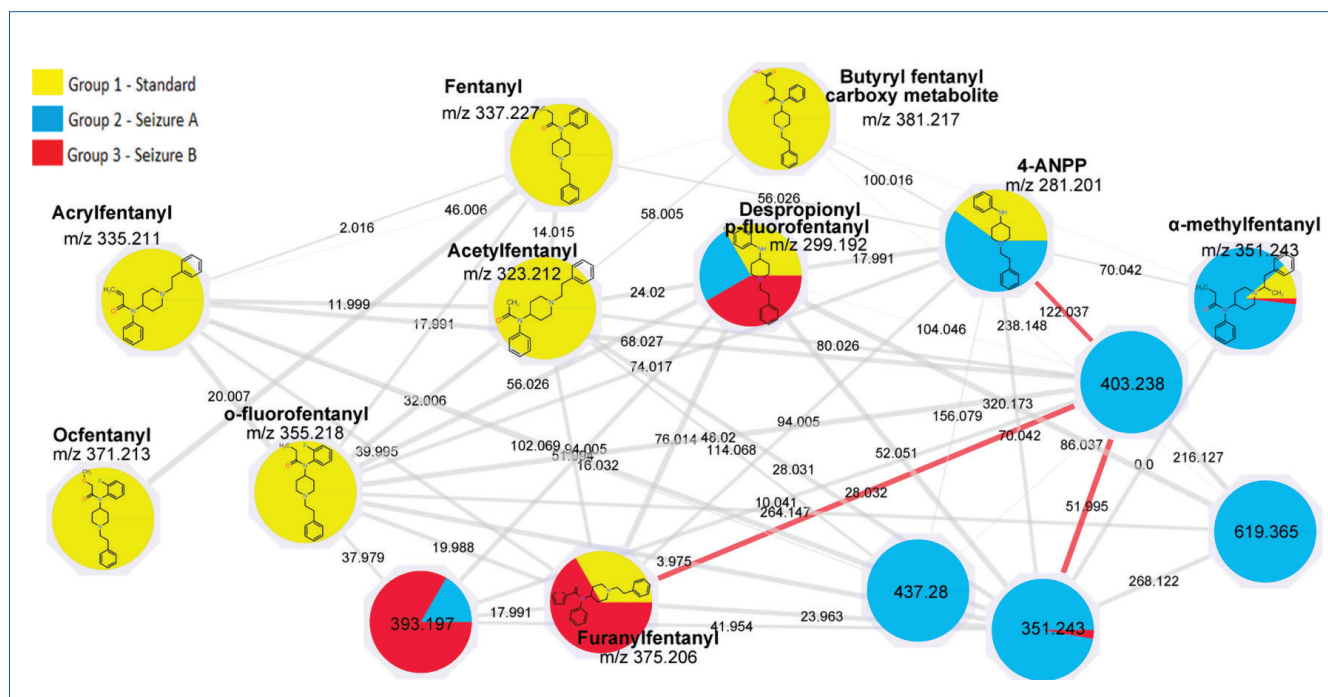


Fig. 5 - Esempio di una famiglia spettrale ottenuta attraverso l'analisi di una miscela di standard analitici di derivati fentanilici (nodi in giallo) e sequestri nei quali sono state rilevate sostanze derivanti dal fentanyl (nodi in blu e rosso). Gli spettri incogniti sono stati collegati ai nodi degli standard favorendo l'individuazione delle molecole incognite 4-fluoro-furanil fentanyl (m/z 393.197) e isobutirrilfentanyl (m/z 351.243). Tratta da: F. Vincenti *et al.*, *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8, 572952. Licenza: CC BY

Il MN è una strategia computazionale avanzata che supporta la visualizzazione e l'interpretazione di dati complessi, ottenuti dalle analisi di dati acquisiti attraverso la MS, in reti chimiche interpretabili. Mediante il confronto degli spettri di frammentazione (MS/MS), il MN consente di identificare somiglianze strutturali tra le molecole presenti in un dataset, raggruppando composti strutturalmente affini in reti molecolari correlate tra loro. Ciò avviene poiché questa strategia innovativa sfrutta il presupposto che molecole strutturalmente simili generano *pattern* di frammentazione analoghi, di conseguenza, saranno correlate all'interno della stessa rete molecolare (Fig. 4).

Nel MN i dati MS/MS vengono rappresentati graficamente in famiglie spettrali, in cui ogni nodo rappresenta uno ione con uno spettro di frammentazione associato, mentre i collegamenti tra i diversi nodi evidenziano le somiglianze spettrali [14]. In questo modo è possibile estendere le informazioni note su molecole conosciute e già identificate, a molecole sconosciute ma strutturalmente affini, facilitando l'identificazione di queste ultime.

Il MN, dunque, risulta particolarmente efficace per il rilevamento e l'identificazione di composti non noti, come ad esempio per le NPS e i loro metaboliti, contribuendo a superare i principali limiti che ad oggi esistono per individuare queste sostanze in sequestri e campioni biologici senza avere informazioni a priori sulla struttura chimica delle sostanze.

Con l'evoluzione delle esigenze analitiche, sono stati sviluppati diversi modelli di MN, ognuno dei quali progettato per rispondere a specifiche necessità. Il Classic Molecular Networking (CMN) rappresenta il metodo originario, basato solo ed esclusivamente sulla similarità degli spettri MS/MS; il Feature-Based Molecular Networking (FBMN) si basa sempre sulle similarità spettrali MS/MS, integrando però le informazioni cromatografiche, quali tempo di ritenzione o intensità, permettendo di separare specie isomeriche; l'Ion Identity Molecular Networking (IIMN), l'ultimo modello di MN sviluppato, consente di ottenere una migliore identificazione poiché si tratta di un modello che integra le similarità MS/MS, le informa-

zioni cromatografiche, e, inoltre, raggruppa in un unico nodo le diverse forme ioniche di uno stesso composto, riducendo il numero di ioni non identificati.

L'analisi di dati HRMS e la creazione di reti molecolari facilmente interpretabili attraverso il MN, necessita di diversi software open access, quali *MZmine* o la piattaforma *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS).

In uno studio condotto da Cavalcanti *et al.* [15] è stata dimostrata l'efficacia del MN nel costruire una rete molecolare basata sulla somiglianza spettrale di cannabinoidi sintetici, identificando un cannabinoide sconosciuto sulla base di differenze di massa. In un ulteriore studio condotto dal nostro gruppo di ricerca [12], siamo riusciti a ipotizzare le strutture incognite di due derivati del fentanyl, in base alla differenza di massa del precursore tra i diversi nodi identificati nella rete molecolare (Fig. 5).

Il MN si dimostra quindi come uno strumento estremamente potente nello studio delle NPS, gruppo di sostanze in continua evoluzione e molto spesso prive di standard di riferimento, senza i quali non è possibile una loro identificazione certa. In particolare, il MN consente di riconoscere analoghi strutturali di NPS già note, evidenziando pattern di frammentazioni comuni, e contribuendo ad accelerare il processo di identificazione di nuove varianti.

Questo consente di avere uno strumento molto potente nel contrasto alla diffusione di NPS, garantendo di non essere più "un passo indietro", ma forse un passo avanti.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Shafi, A.J. Berry *et al.*, *Ther. Adv. Psychopharmacol.*, 2020, **17**(10), 2045125320967197, DOI: [10.1177/2045125320967197](https://doi.org/10.1177/2045125320967197)
- [2] S. Chiappini, A. Mosca *et al.*, *Medicina*, 2021, **57**, 580, DOI: [10.3390/medicina57060580](https://doi.org/10.3390/medicina57060580)
- [3] S. Zaami, E. Marinelli *et al.*, *Front Psychiatry*, 2020, **11**, 700, DOI: [10.3389/fpsy.2020.00700](https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00700)
- [4] F. Zapata, J.M. Matey *et al.*, *Microchem. J.*, 2021, **163**, 105877, DOI: [10.1016/j.microc.2020.105877](https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105877)
- [5] A. O'Hagan, C. Smith, *Forensic Research & Criminology Int. J.*, 2017, **5**(3) 322, DOI: [10.15406/frcij.2017.05.00159](https://doi.org/10.15406/frcij.2017.05.00159)
- [6] European Union Drugs Agency (EUDA). European Drug Report 2025: Trends and Developments, Lisbona, European Union Drugs Agency, 2025, https://www.euda.europa.eu/publications/european-drug-report/2025_en
- [7] L. Mazdai, M. Fabbri *et al.*, *Biomedicine*, 2022, **10**, 1398, DOI: [10.3390/biomedicines10061398](https://doi.org/10.3390/biomedicines10061398)
- [8] K. Bae, N. Ji Kwon *et al.*, *Forensic Sci. Int.*, 2018, **292**, 45, DOI: [10.1016/j.forsciint.2018.09.008](https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.09.008)
- [9] S. Pascual-Caro, F. Borrull *et al.*, *Tr. Anal. Chem.*, 2022, **156**, 116705, DOI: [10.1016/j.trac.2022.116705](https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116705)
- [10] C. Seger, L. Salzmann, *Clin. Biochem.*, 2020, **82**, 11, DOI: [10.1016/j.clinbiochem.2020.03.004](https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.03.004)
- [11] C. D'Ovidio, M. Locatelli *et al.*, *Molecules*, 2023, **28**, 2127, DOI: [10.3390/molecules28052127](https://doi.org/10.3390/molecules28052127)
- [12] F. Vincenti, C. Montesano *et al.*, *Front. Chem.*, 2020, **8**, 572952, DOI: [10.3389/fchem.2020.572952](https://doi.org/10.3389/fchem.2020.572952)
- [13] S. Allard, P.M. Allard *et al.*, *Drug Test. Anal.*, 2019, **11**, 669, DOI: [10.1002/dta.2550](https://doi.org/10.1002/dta.2550)
- [14] T. Gicquel, R. Pelletier *et al.*, *Tr. Anal. Chem.*, 2024, **172**, 117547, DOI: [10.1016/j.trac.2024.117547](https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117547)
- [15] G. De Albuquerque Cavalcanti, R. Moreira Borges *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2021, **32**, 2417, DOI: [10.1021/jasms.1c00124](https://doi.org/10.1021/jasms.1c00124)

NPS: New Analytical Strategies for New Drugs

The rapid rise of New Psychoactive Substances (NPS) poses a growing public health challenge. High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) is the preferred technique for their identification. Molecular Networking (MN) enhances HRMS's identification potential by grouping mass spectra into spectral families.

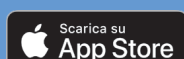
Da più di cento anni la rivista per chi si occupa di **Chimica in Italia**

La **Chimica e l'Industria** è un periodico di scienza e tecnologia e di informazione per i chimici.

Fondata nel 1919 con lo scopo di promuovere lo studio e la diffusione della chimica e delle sue applicazioni, La Chimica e l'Industria è da allora l'organo di stampa ufficiale della Società Chimica Italiana.

La rivista ospita articoli su argomenti di interesse rilevante per tutti coloro che operano in questo settore e propone approfondimenti scientifici di carattere applicativo, tecnologico e informativo nei molteplici ambiti della chimica.

**Scarica la app gratuita per leggere
La Chimica e l'Industria
sui tuoi dispositivi elettronici**



Per proposte pubblicitarie
contattare domenicacipriani@agicom.it

